



DESDE 1902
INSTITUTO DE HIGIENE E
MEDICINA TROPICAL
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA



UNIVERSIDADE
NOVA
DE LISBOA

Efeito inibitório de compostos naturais em culturas planctónicas e biofilmes de *Candida*

Bruna Filipa Mendes Balau

Dissertação para obtenção do
Grau de Mestre em Microbiologia Médica

Janeiro 2018



DESDE 1902
INSTITUTO DE HIGIENE E
MEDICINA TROPICAL
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA



UNIVERSIDADE
NOVA
DE LISBOA

Efeito inibitório de compostos naturais em culturas planctónicas e biofilmes de *Candida*

Bruna Filipa Mendes Balau

Dissertação para obtenção do
Grau de Mestre em Microbiologia Médica

Orientador: Professor Doutor João Inácio Silva, Instituto de Higiene e Medicina
Tropical, Universidade Nova de Lisboa

Co-orientador: Professora Doutora Maria Manuel Lopes, Faculdade de Farmácia,
Universidade Nova de Lisboa

**Instituto de Higiene e Medicina Tropical,
Unidade de Micologia Médica**

Janeiro 2018

AGRADECIMENTOS

Chega então o momento de expressar os meus mais sinceros agradecimentos a todas as pessoas que, de alguma forma, contribuíram para a concretização deste trabalho:

Aos meus pais, por todo o carinho e motivação, e em especial à minha irmã, por toda a paciência e apoio neste período.

Ao meu orientador, Professor Doutor João Inácio sempre disponível para me ajudar, esclarecer dúvidas a qualquer hora e pela valiosa orientação.

À técnica Ana Paula Madura, pela simpatia e sempre pronta e disponível a ajudar com o necessário.

À Universidade do Minho, pela estirpe que generosamente ofereceram e que foi tão preciosa para este trabalho.

Aos meus amigos, por todo o apoio.

À Mafalda Dançante, por toda a ajuda, carinho, apoio e todos os momentos de descontração dentro e fora do laboratório e pela sua amizade.

Aos meus colegas do aeroporto, especialmente ao João Duarte, pelas palavras de apoio e força transmitida.

RESUMO

A incidência e prevalência de infecções fúngicas invasivas tem aumentado, especialmente em pacientes imunocomprometidos e hospitalizados com doenças graves subjacentes. Várias espécies de *Candida* são os principais agentes etiológicos destes tipos de infecção, particularmente *Candida albicans*. A patogenicidade das espécies de *Candida* é atribuída a vários factores de virulência, incluindo a capacidade de formar biofilmes, que apresentam níveis mais altos de resistência antifúngica. Tem sido explorado o uso de produtos naturais, como extractos de óleos essenciais de plantas, como estratégias terapêuticas antifúngicas alternativas. No entanto, estes compostos que ocorrem naturalmente ainda não encontraram nenhum papel estabelecido na formulação de produtos antifúngicos farmacêuticos convencionais. Além disso, a maioria dos trabalhos publicados avalia a actividade antifúngica destes compostos em células planctónicas de leveduras, existindo uma lacuna de conhecimento sobre a acção potencial que estes compostos podem ter contra os biofilmes de leveduras. Este trabalho teve como objetivo avaliar a actividade antifúngica de extractos de óleos essenciais e eventual sinergia que estes compostos podem ter com antifúngicos convencionais, contra isolados de *Candida* crescendo tanto em culturas planctónicas como em biofilmes.

A Concentração Mínima Inibitória (CMI) de vários produtos naturais, como o carvacrol, o eugenol e o timol, contra os isolados de *C. albicans* e de outras espécies de *Candida* clinicamente relevantes foi avaliada utilizando um método padrão de microdiluição. Os produtos naturais foram testados individualmente e em combinação com fluconazol e voriconazol. A actividade antifúngica de uma selecção de produtos naturais, isolada e em combinação com fluconazol, também foi testada num modelo de biofilme de *Candida* por meio de um teste colorimétrico semiquantitativo baseado na redução do sal de tetrazólio (XTT).

Dos compostos naturais testados, os que mostraram a atividade antifúngica mais evidente, contra a maioria das culturas de *Candida* testadas, foram o carvacrol, o eugenol e o timol. A sinergia antifúngica interessante entre carvacrol e eugenol e os antifúngicos convencionais fluconazol e voriconazol também foi observada contra a maioria das culturas de *Candida*. A sinergia antifúngica entre o carvacrol e o fluconazol

também foi observada quando as combinações destes compostos foram testadas contra uma estirpe resistente de *C. albicans* que cresceu como biofilme. Os resultados revelaram uma interessante actividade antifúngica de alguns compostos naturais, isolados e em combinação com agentes antifúngicas convencionais, inclusive contra os biofilmes de *Candida*.

Palavras-chave: compostos naturais, *Candida*, biofilmes, resistência antifúngica

ABSTRACT

The incidence and prevalence of invasive fungal infections has been increasing, especially in immunocompromised and hospitalized patients with serious underlying diseases. Several species of *Candida* are the main etiological agents of these types of infection, particularly *Candida albicans*. Pathogenicity of *Candida* species is attributed to several virulence factors including the capability to form biofilms, which show higher levels of antifungal resistance. The use of natural products, such as extracts of plant's essential oils, have been explored as alternative antifungal therapeutic strategies. However, these naturally occurring compounds have not yet found any established role in the formulation of conventional pharmaceutical antifungal products. In addition, most published works assessed the antifungal activity of these compounds in planktonic yeast cells, existing a knowledge gap on the potential action these compounds may have against yeast biofilms. This work aimed to assess the antifungal activity of extracts of essential oils, and the eventual synergy these compounds may have with conventional antifungal drugs, against isolates of *Candida* growing as planktonic cultures and as biofilms.

The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of several natural products, such as carvacrol, eugenol and thymol, against isolates of *C. albicans* and of other clinically relevant *Candida* species was assessed using a standard microdilution method. Natural products were tested alone and as a combination with fluconazole and voriconazole. The antifungal activity of a selection of natural products, alone and in combination with fluconazole, was also tested against a biofilm model of *Candida* by a semiquantitative colorimetric assay based on the reduction of tetrazolium salt (XTT).

Of the natural compounds tested, the ones which showed the most evident antifungal activity, against most *Candida* cultures tested, were carvacrol, eugenol and thymol. Antifungal synergy between carvacrol and eugenol and the conventional antifungals fluconazole and voriconazole was also noticed against most planktonic *Candida* cultures. Antifungal synergy between carvacrol and fluconazole was also noticed when combinations of these compounds were tested against a resistant strain of *C. albicans* growing as biofilm. Results revealed an interesting antifungal activity of some natural

compounds, alone and in combination with conventional antifungal drugs, including against *Candida* biofilms.

Keywords: natural products, *Candida*, biofilms, antifungal resistance

ÍNDICE GERAL

1. Introdução	1
1.1. Leveduras do género <i>Candida</i>	2
1.2. Biofilmes	4
1.3. Antifúngicos	8
1.3.1. Fluconazol.....	10
1.3.2. Voriconazol.....	11
1.4. Compostos naturais	12
1.4.1. Carvacrol.....	16
1.4.2. Timol.....	16
1.4.3. α -Pineno	17
1.4.4. Linalool	18
1.4.5. Citronelal.....	19
1.4.6. Nerolidol	19
1.4.7. Eugenol	20
1.5. Método de microdiluição para determinação de concentrações mínimas inibitórias de compostos antifúngicos	21
1.6. Métodos usados para os estudo da sinergia entre compostos antifúngicos	22
1.7. Objetivos do trabalho e plano de dissertação	25
2. Materiais e métodos	26
2.1. Reagentes e soluções	27
2.1.1. Compostos naturais.....	27
2.1.2. Compostos antifúngicos.....	28
2.1.3. XTT e menadiona	28
2.2. Origem das estirpes em estudo	29
2.3. Meios de cultura	29
2.3.1. <i>Potato Dextrose Agar</i> (PDA).....	29
2.3.2. Meio RPMI-1640	29

2.3.3. <i>Sabouraud Dextrose Broth</i> (SDB)	30
2.4. Ensaio antimicrobianos	30
2.4.1. Determinação da susceptibilidade de <i>Candida</i> aos compostos naturais e agentes antifúngicos	30
Preparação das microplacas.....	31
Preparação do inóculo	32
Inoculação das microplacas	33
Leitura das microplacas	34
2.4.2. Sinergia entre compostos naturais e agentes antifúngicos	34
Preparação das microplacas.....	34
Preparação do inóculo	35
Inoculação das microplacas	35
Leitura das microplacas	36
Determinação do efeito sinérgico entre agentes antifúngicos e compostos naturais	36
2.4.3. Inibição <i>in vitro</i> de biofilmes.....	37
Preparação do inóculo	37
Formação do biofilme.....	37
Soluções de trabalho de fluconazol, carvacrol e combinações destes compostos	38
Actividade antifúngica nos biofilmes	38
Actividade metabólica dos biofilmes	39
3. Resultados.....	41
3.1. Susceptibilidade de <i>Candida albicans</i> ATCC 90028 aos composto naturais e agentes antifúngicos	42
3.2. Susceptibilidade de <i>Candida</i> spp. ao carvacrol, eugenol, timol, fluconazol e voriconazol	43
3.3. Sinergia na actividade antifúngica entre compostos naturais, fluconazol e voriconazol	45
3.4. Inibição <i>in vitro</i> de biofilmes de <i>Candida albicans</i> SER7	55

4. Discussão e conclusão	58
4.1. Susceptibilidade de <i>Candida albicans</i> ATCC 90028 aos compostos naturais e agentes antifúngicos	59
4.2. Susceptibilidade de <i>Candida</i> spp. ao carvacrol, eugenol, timol, fluconazol e voriconazol	62
4.3. Sinergia na actividade antifúngica entre compostos naturais, fluconazol e voriconazol	64
4.4. Inibição <i>in vitro</i> de biofilmes de <i>Candida albicans</i> SER7	66
4.5. Considerações finais	68
5. Referências bibliográficas.....	72
6. Anexos	86

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.(A) Células de <i>Candida albicans</i> observadas ao microscópio, coradas com azul-de-metileno	2
Figura 1.(B) Cultura de <i>Candida albicans</i>	2
Figura 2. Microscopia electrónica de varredura de um biofilme de <i>Candida albicans</i>	5
Figura 3. Formação do biofilme de <i>Candida albicans</i>	6
Figura 4. Esquema síntese do mecanismo de acção de um azol (fluconazol)	9
Figura 5. Estrutura molecular do fluconazol	10
Figura 6. Estrutura molecular do voriconazol	11
Figura 7. Estrutura molecular do carvacrol	16
Figura 8. Estrutura molecular do timol	17
Figura 9. Estrutura molecular dos enantiómeros de α e β -pineno	17
Figura 10. Estrutura molecular do linalool	18
Figura 11. Estrutura molecular do citronelal	19
Figura 12. Estrutura molecular do nerolidol.....	20
Figura 13. Estrutura molecular do eugenol.....	20
Figura 14. Esquema de diluições seriadas utilizadas para preparar a gama de concentrações de composto natural/agente antifúngico em meio RPMI-1640 2%G (2×)	31
Figura 15. Esquema geral de distribuição das soluções de trabalho dos compostos naturais e antifúngicos e meio RPMI-1640 2%G (2×) pelos poços da microplaca.....	32
Figura 16. Esquema geral de distribuição das soluções de trabalho de agente antifúngico vs composto natural pela microplaca	35
Figura 17. Esquema final obtido após as diluições seriadas dos compostos e misturas em estudo, e controlos positivo e negativo	39
Figura 18. Resultados do teste de redução do XTT de modo a avaliar os efeitos de fluconazol e carvacrol, isoladamente e em combinações de diferentes proporções, em biofilmes de <i>Candida albicans</i> SER 7	55-56

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Classificação taxonômica convencional das espécies do gênero <i>Candida</i>	2
Tabela 2. Compostos naturais em estudo com respectivas gamas de concentração a serem testadas para a determinação da CMI e concentração das soluções concentradas (soluções <i>stock</i>).....	27
Tabela 3. Agentes antifúngicos em estudo com respectivas gamas de concentração a serem testadas para a determinação da CMI e concentração das soluções concentradas (soluções <i>stock</i>).....	28
Tabela 4. Misturas das soluções de trabalho de fluconazol e carvacrol em diferentes proporções, usadas para testar a sinergia potencial dos compostos antimicrobianos no modelo de biofilmes.....	38
Tabela 5. Concentração mínima inibitória de compostos naturais e agentes antifúngicos contra <i>Candida albicans</i> ATCC 90028	42
Tabela 6. Concentração mínima inibitória de compostos naturais e agentes antifúngicos relativamente a três estirpes de <i>Candida parapsilosis</i>	43
Tabela 7. Concentração mínima inibitória de compostos naturais e agentes antifúngicos relativamente às duas estirpes de <i>Candida krusei</i> estudadas e à estirpe de <i>Candida albicans</i> SER7.....	44
Tabela 8. Concentração mínima inibitória de compostos naturais e agentes antifúngicos relativamente às duas estirpes de <i>Candida glabrata</i> e <i>Candida guilliermondii</i>	44
Tabela 9. Índice de concentração inibitória fraccional para misturas com concentrações diferentes de fluconazol e carvacrol relativamente a <i>Candida parapsilosis</i> 236/11	46
Tabela 10. Índice de concentração inibitória fraccional para misturas com concentrações diferentes de fluconazol e eugenol relativamente a <i>Candida parapsilosis</i> 246/11.....	46
Tabela 11. Índice de concentração inibitória fraccional para misturas com concentrações diferentes de voriconazol e carvacrol relativamente a <i>Candida parapsilosis</i> 236/11	47
Tabela 12. Índice de concentração inibitória fraccional para misturas com concentrações diferentes de voriconazol e eugenol relativamente a <i>Candida parapsilosis</i> 236/11.....	47
Tabela 13. Índice de concentração inibitória fraccional para misturas com concentrações diferentes de fluconazol e carvacrol relativamente a <i>Candida krusei</i> 5/11	48

Tabela 14. Índice de concentração inibitória fraccional para misturas com concentrações diferentes de fluconazol e eugenol relativamente a <i>Candida krusei</i> 5/11	48
Tabela 15. Índice de concentração inibitória fraccional para misturas com concentrações diferentes de fluconazol e timol relativamente a <i>Candida krusei</i> 5/11.....	49
Tabela 16. Índice de concentração inibitória fraccional para misturas com concentrações diferentes de voriconazol e carvacrol relativamente a <i>Candida krusei</i> 5/11	49
Tabela 17. Índice de concentração inibitória fraccional para misturas com concentrações diferentes de voriconazol e eugenol relativamente a <i>Candida krusei</i> 5/11	50
Tabela 18. Índice de concentração inibitória fraccional para misturas com concentrações diferentes de fluconazol e carvacrol relativamente a <i>Candida glabrata</i> 531/14.....	50
Tabela 19. Índice de concentração inibitória fraccional para misturas com concentrações diferentes de fluconazol e eugenol relativamente a <i>Candida glabrata</i> 531/14	51
Tabela 20. Índice de concentração inibitória fraccional para misturas com concentrações diferentes de fluconazol e timol relativamente a <i>Candida glabrata</i> 531/14.....	51
Tabela 21. Índice de concentração inibitória fraccional para misturas com concentrações diferentes de voriconazol e carvacrol relativamente a <i>Candida glabrata</i> 531/14	52
Tabela 22. Índice de concentração inibitória fraccional para misturas com concentrações diferentes de voriconazol e eugenol relativamente a <i>Candida glabrata</i> 531/14	52
Tabela 23. Índice de concentração inibitória fraccional para misturas com concentrações diferentes de voriconazol e timol relativamente a <i>Candida glabrata</i> 531/14.....	53
Tabela 24. Índice de concentração inibitória fraccional para misturas com concentrações diferentes de fluconazol e timol relativamente a <i>Candida albicans</i> SER7.....	54
Tabela 25. Índice de concentração inibitória fraccional para misturas com concentrações diferentes de voriconazol e timol relativamente a <i>Candida albicans</i> SER7.....	54
Tabela 26. Concentração mínima inibitória séssil de carvacrol e fluconazol contra <i>Candida albicans</i> SER7.....	56
Tabela 27. Concentração mínima inibitória das combinações de carvacrol e fluconazol contra <i>Candida albicans</i> SER7 e respectivos índices CIF	57
Tabela A1. Médias de absorvâncias para determinação das CMI ₅₀ e CMI ₈₀ de compostos naturais e agentes antifúngicos contra <i>Candida albicans</i> ATCC 90028	87
Tabela A2. Médias de absorvâncias para determinação das CMI ₅₀ e CMI ₈₀ de compostos naturais e agentes antifúngicos contra <i>Candida albicans</i> SER7	88

Tabela A3. Médias de absorvâncias para determinação das CMI ₅₀ e CMI ₈₀ de compostos naturais e agentes antifúngicos contra <i>Candida parapsilosis</i> CAN260	88
Tabela A4. Médias de absorvâncias para determinação das CMI ₅₀ e CMI ₈₀ de compostos naturais e agentes antifúngicos contra <i>Candida parapsilosis</i> 59/13.....	89
Tabela A5. Médias de absorvâncias para determinação das CMI ₅₀ e CMI ₈₀ de compostos naturais e agentes antifúngicos contra <i>Candida parapsilosis</i> 246/11.....	89
Tabela A6. Médias de absorvâncias para determinação das CMI ₅₀ e CMI ₈₀ de compostos naturais e agentes antifúngicos contra <i>Candida krusei</i> 5/11	90
Tabela A7. Médias de absorvâncias para determinação das CMI ₅₀ e CMI ₈₀ de compostos naturais e agentes antifúngicos contra <i>Candida krusei</i> 282/09	90
Tabela A8. Médias de absorvâncias para determinação das CMI ₅₀ e CMI ₈₀ de compostos naturais e agentes antifúngicos contra <i>Candida glabrata</i> 50/14	91
Tabela A9. Médias de absorvâncias para determinação das CMI ₅₀ e CMI ₈₀ de compostos naturais e agentes antifúngicos contra <i>Candida glabrata</i> 531/14	91
Tabela A10. Médias de absorvâncias para determinação das CMI ₅₀ e CMI ₈₀ de compostos naturais e agentes antifúngicos contra <i>Candida guilliermondii</i> 112/13	92
Tabela A11. Médias de absorvâncias obtidas nos testes para determinar a existência de sinergia na actividade antifúngica de misturas entre fluconazol e carvacrol a diferentes concentrações contra <i>Candida parapsilosis</i> 246/11	93
Tabela A12. Médias de absorvâncias obtidas nos testes para determinar a existência de sinergia na actividade antifúngica de misturas entre fluconazol e eugenol a diferentes concentrações contra <i>Candida parapsilosis</i> 246/11	94
Tabela A13. Médias de absorvâncias obtidas nos testes para determinar a existência de sinergia na actividade antifúngica de misturas entre fluconazol e timol a diferentes concentrações contra <i>Candida parapsilosis</i> 246/11	95
Tabela A14. Médias de absorvâncias obtidas nos testes para determinar a existência de sinergia na actividade antifúngica de misturas entre voriconazol e carvacrol a diferentes concentrações contra <i>Candida parapsilosis</i> 246/11	96
Tabela A15. Médias de absorvâncias obtidas nos testes para determinar a existência de sinergia na actividade antifúngica de misturas entre voriconazol e eugenol a diferentes concentrações contra <i>Candida parapsilosis</i> 246/11	97

Tabela A16. Médias de absorvâncias obtidas nos testes para determinar a existência de sinergia na actividade antifúngica de misturas entre voriconazol e timol a diferentes concentrações contra <i>Candida parapsilosis</i> 246/11	98
Tabela A17. Médias de absorvâncias obtidas nos testes para determinar a existência de sinergia na actividade antifúngica de misturas entre fluconazol e carvacrol a diferentes concentrações contra <i>Candida krusei</i> 5/11	99
Tabela A18. Médias de absorvâncias obtidas nos testes para determinar a existência de sinergia na actividade antifúngica de misturas entre fluconazol e eugenol a diferentes concentrações contra <i>Candida krusei</i> 5/11	100
Tabela A19. Médias de absorvâncias obtidas nos testes para determinar a existência de sinergia na actividade antifúngica de misturas entre fluconazol e timol a diferentes concentrações contra <i>Candida krusei</i> 5/11	101
Tabela A20. Médias de absorvâncias obtidas nos testes para determinar a existência de sinergia na actividade antifúngica de misturas entre voriconazol e carvacrol a diferentes concentrações contra <i>Candida krusei</i> 5/11	102
Tabela A21. Médias de absorvâncias obtidas nos testes para determinar a existência de sinergia na actividade antifúngica de misturas entre voriconazol e eugenol a diferentes concentrações contra <i>Candida krusei</i> 5/11	103
Tabela A22. Médias de absorvâncias obtidas nos testes para determinar a existência de sinergia na actividade antifúngica de misturas entre voriconazol e timol a diferentes concentrações contra <i>Candida krusei</i> 5/11	104
Tabela A23. Médias de absorvâncias obtidas nos testes para determinar a existência de sinergia na actividade antifúngica de misturas entre fluconazol e carvacrol a diferentes concentrações contra <i>Candida glabrata</i> 531/14	105
Tabela A24. Médias de absorvâncias obtidas nos testes para determinar a existência de sinergia na actividade antifúngica de misturas entre fluconazol e eugenol a diferentes concentrações contra <i>Candida glabrata</i> 531/14	106
Tabela A25. Médias de absorvâncias obtidas nos testes para determinar a existência de sinergia na actividade antifúngica de misturas entre fluconazol e timol a diferentes concentrações contra <i>Candida glabrata</i> 531/14	107

Tabela A26. Médias de absorvâncias obtidas nos testes para determinar a existência de sinergia na actividade antifúngica de misturas entre voriconazol e carvacrol a diferentes concentrações contra <i>Candida glabrata</i> 531/14	108
Tabela A27. Médias de absorvâncias obtidas nos testes para determinar a existência de sinergia na actividade antifúngica de misturas entre voriconazol e eugenol a diferentes concentrações contra <i>Candida glabrata</i> 531/14	109
Tabela A28. Médias de absorvâncias obtidas nos testes para determinar a existência de sinergia na actividade antifúngica de misturas entre voriconazol e timol a diferentes concentrações contra <i>Candida glabrata</i> 531/14	110
Tabela A29. Médias de absorvâncias obtidas nos testes para determinar a existência de sinergia na actividade antifúngica de misturas entre fluconazol e carvacrol a diferentes concentrações contra <i>Candida albicans</i> SER7	111
Tabela A30. Médias de absorvâncias obtidas nos testes para determinar a existência de sinergia na actividade antifúngica de misturas entre fluconazol e eugenol a diferentes concentrações contra <i>Candida albicans</i> SER7	112
Tabela A31. Médias de absorvâncias obtidas nos testes para determinar a existência de sinergia na actividade antifúngica de misturas entre fluconazol e timol a diferentes concentrações contra <i>Candida albicans</i> SER7	113
Tabela A32. Médias de absorvâncias obtidas nos testes para determinar a existência de sinergia na actividade antifúngica de misturas entre voriconazol e carvacrol a diferentes concentrações contra <i>Candida albicans</i> SER7	114
Tabela A33. Médias de absorvâncias obtidas nos testes para determinar a existência de sinergia na actividade antifúngica de misturas entre voriconazol e eugenol a diferentes concentrações contra <i>Candida albicans</i> SER7	115
Tabela A34. Médias de absorvâncias obtidas nos testes para determinar a existência de sinergia na actividade antifúngica de misturas entre voriconazol e timol a diferentes concentrações contra <i>Candida albicans</i> SER7	116
Tabela A35. Médias de absorvâncias para determinação da CMIS ₅₀ e CMIS ₈₀ de fluconazol e carvacrol individualmente e em combinações de diferentes proporções contra <i>Candida albicans</i> SER7	117

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Leveduras do género *Candida*

O género *Candida* é constituído por leveduras unicelulares de forma oval, elíptica ou cilíndrica, cujo tamanho varia entre 3 e 5µm (Figura 1A). Quando inoculadas em meio *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA) as colónias apresentam uma cor branca e cremosa, cremes ou amareladas (Figura 1B). Dependendo da espécie, as colónias podem ter uma textura lisa, brilhante ou seca, ou rugosa e baça (López-Martinez, 2010; Silva *et al.*, 2012).

Candida são classificadas taxonomicamente como descrito na Tabela 1.

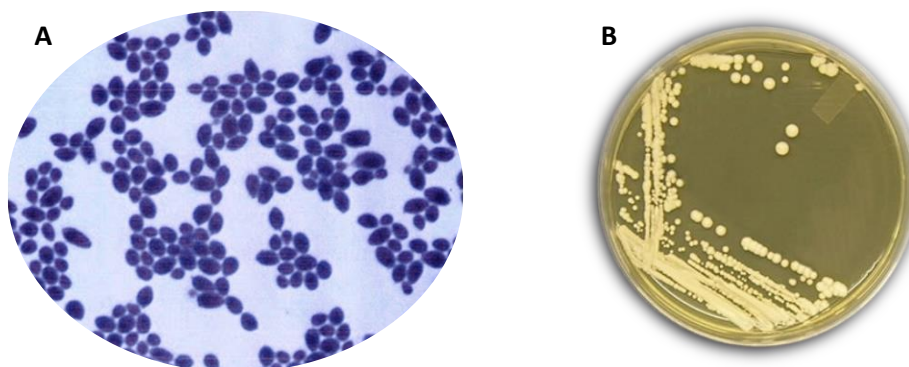


Figura 1. (A) Células de *Candida albicans* observadas ao microscópio óptico, coradas com azul de metileno (adaptado de <https://microbeonline.com>)
(B) Cultura de *C. albicans* (adaptado de <http://medsimples.com>)

Tabela 1. Classificação taxonómica convencional das espécies do género *Candida*

Reino	Fungi
Filo	Ascomycota
Sub-filo	Saccharomycotina
Classe	Sacharomycetes
Ordem	Saccharomycetales
Família	<i>Saccharomycetacea</i>
Género	<i>Candida</i>

As leveduras do género *Candida* são comensais das mucosas, pele, podem colonizar o trato gastrointestinal e genitourinário, podem ser encontradas no trato respiratório e, na mulher, na vagina. No ambiente, são encontradas principalmente em superfícies (Eggimann *et al.*, 2003; Gabardi *et al.*, 2007; Rodrigues e Vaz, 2014).

Existem mais de 200 espécies de *Candida* descritas, mas apenas cerca de 10% são conhecidas por causarem infecções em humanos. (Eggimann *et al.*, 2003). Pacientes gravemente doentes e outros imunocomprometidos são mais propensos a desenvolver infecções superficiais e potencialmente fatais (Hasan *et al.*, 2009).

A incidência e prevalência das infecções fúngicas invasivas (IFI) tem vindo a aumentar, especialmente em pacientes imunocomprometidos e/ou hospitalizados com doenças subjacentes sérias (Pfaller e Diekema, 2007; Bitar *et al.*, 2014).

Infecções causadas por *Candida* são chamadas candidíase ou candidose. As micoses causadas por estes fungos mostram um amplo espectro de representações clínicas desde infecções superficiais, como infecções cutâneas e das mucosas, a profundas e de grande severidade, como é o caso de candidíase invasiva (Sardi *et al.*, 2013).

O principal mecanismo de infecção tem um ponto de partida endógeno (devido à proliferação excessiva ou deslocação da levedura através do intestino) em que as espécies de *Candida* sob condições de debilidade do hospedeiro comportam-se como agentes patogénicos oportunistas. Outro mecanismo é a via exógena que está principalmente associada a contaminação de soluções desinfetantes, de fluidos de alimentação parentérica e contacto com pessoal prestador de cuidados de saúde em ambiente hospitalar (Almeida *et al.*, 2013; Sardi *et al.*, 2013; Rodrigues and Vaz, 2014).

Em Portugal e nos EUA, *Candida* é o quarto agente mais frequentemente isolado a partir do sangue e a oitava causa mais frequente de septicemia na Europa (Coleman *et al.*, 2010; Shalini *et al.*, 2011; Rodrigues e Vaz, 2014).

Várias espécies de *Candida* são conhecidas como agentes etiológicos de infecção em humanos. Mais de 70% de todas as IFI são causadas por *Candida*, contudo, mais de 90% das mesmas são causadas por *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis* e *Candida krusei* (Pfaller and Diekema, 2007; Sanglard e Coste, 2016).

Candida albicans é a principal causa de infecção fúngica invasiva em prematuros, pacientes diabéticos, cirúrgicos, SIDA e outros imunocomprometidos. Nestes casos, o uso intensivo profilático de antifúngicos leva à emergência de estirpes resistentes de *C. albicans* (Batovska *et al.*, 2007). Apesar disto, a incidência de *C. albicans* tem diminuído, enquanto as infecções causadas por espécies de *Candida* não-*albicans* aumentaram (Mandras *et al.*, 2016). As espécies de *Candida* não-*albicans* são mais comuns em pacientes que receberam profilaxia antifúngica e estão associadas a taxas de mortalidade mais elevadas comparando com *C. albicans* (Gabardi *et al.*, 2007).

Em Portugal, a espécie mais frequentemente isolada é *C. albicans* seguida de *C. parapsilosis* (Faria-Ramos *et al.*, 2014; Rodrigues e Vaz, 2014).

1.2. Biofilmes

A patogenicidade de espécies de *Candida* é atribuída a certos factores de virulência, tais como, habilidade de fugir às defesas do hospedeiro, aderência, formação de biofilmes e a produção de enzimas hidrolíticas que destroem o tecido como proteases, fosfolipases e hemolisinas (Sardi *et al.*, 2013).

Um biofilme é definido como uma comunidade de microrganismos altamente estruturada, e irreversivelmente associada a superfícies, que está incluída numa matriz extracelular protectora rica em polissacáridos (Pierce *et al.*, 2008; Chandra e Mukherjee, 2015). Biofilmes microbianos podem formar-se na natureza mas também dentro do hospedeiro, tornando-se clinicamente relevantes uma vez que esta estrutura é capaz de suportar agressões ambientais, incluindo resistência a antifúngicos convencionais (Pierce *et al.*, 2008; Curvelo *et al.*, 2014).

Candida albicans é um fungo dimórfico, que é capaz de mudar da fase de levedura para a fase filamentosa. As formas filamentosas de *C. albicans* são importantes para a patogenicidade e desempenham um papel crítico no desenvolvimento da arquitectura organizada espacialmente vista em biofilmes maduros altamente estruturados (Figura 2) (He *et al.*, 2007).

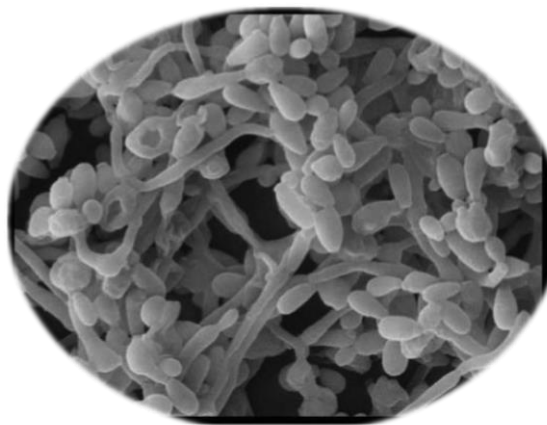


Figura 2. Microscopia electrónica de varredura de um biofilme de *Candida albicans* (adaptado de Sardi *et al.*, 2013)

Candida albicans é considerada a levedura patogénica com maior capacidade de crescer em biofilme (Santana *et al.*, 2015). É versátil para estabelecer biofilmes numa variedade de superfícies desde o tecido humano (p.e. membranas mucosas) até aos dispositivos médicos (You *et al.*, 2013). Para além desta espécie, também *C. lusitaniae*, *C. krusei*, *C. pelliculosa*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* e *C. parapsilosis* conseguem produzir biofilmes, esta última espécie, com uma variabilidade elevada da matriz extracelular em relação a *C. albicans* (Hasan *et al.*, 2009; Sardi *et al.*, 2013).

Na formação do biofilme, o primeiro factor de colonização fúngica de tecidos humanos é a aderência a superfícies do hospedeiro. A ligação inicial das células de *Candida* a superfícies de dispositivos médicos é mediada por factores não específicos (hidrofobicidade e forças electrostáticas) e promovida por adesinas específicas presentes na superfície das células fúngicas que reconhecem ligandos como proteínas, fibrinogénio e fibronectina. A adesão é feita por proteínas de superfície especializadas - adesinas, que especificamente ligam aos aminoácidos e açúcares na superfície de outras células ou promovem a aderência a superfícies abióticas. Este processo de adesão é depois seguido pelo processo de maturação do biofilme (Sardi *et al.*, 2013). A figura 3 ilustra o processo da formação do biofilme de *C. albicans*.

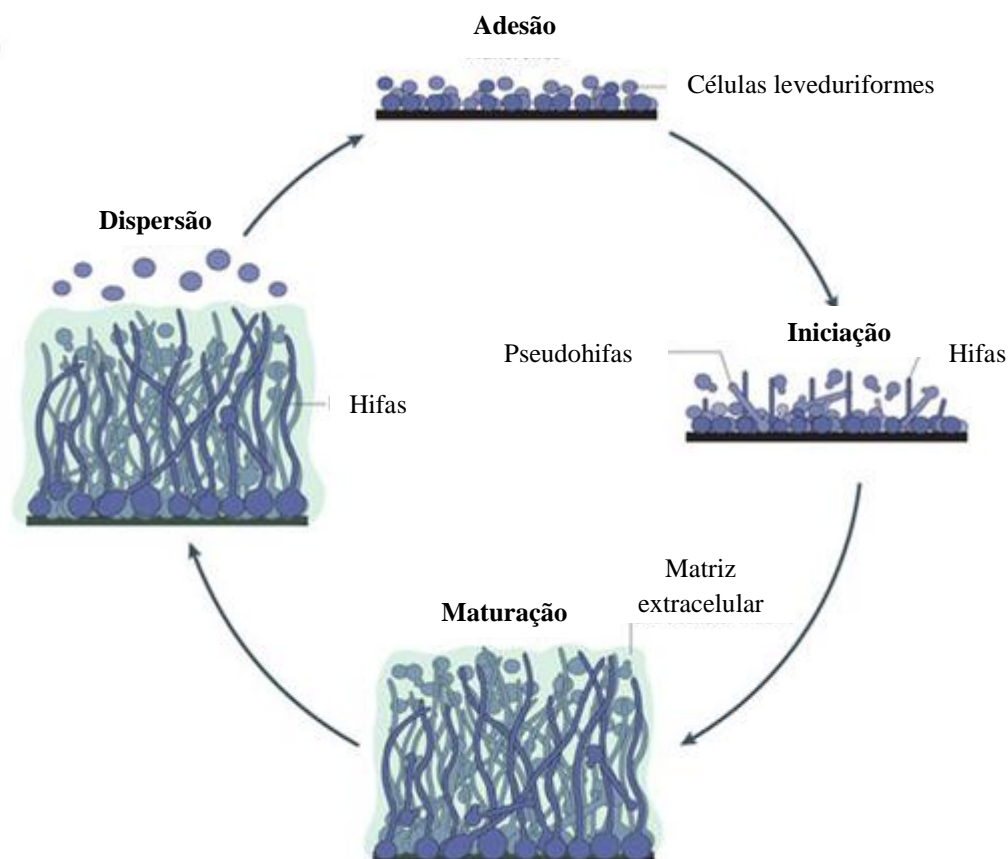


Figura 3. Formação do biofilme de *Candida albicans*. A formação do biofilme é dividida em 4 fases principais: aderência de células à superfície; iniciação da formação do biofilme, durante a qual as células aderidas à superfície formam uma camada basal com células do tipo levedura, pseudo-hifas e hifas (também conhecida como a fase de proliferação); maturação num biofilme complexo e estruturado, em que as células estão encerradas numa matriz extracelular; e dispersão das células do tipo levedura do biofilme para outros locais (adaptado de Lohse *et al.*, 2018).

Vários grupos de investigadores têm demonstrado que biofilmes fúngicos mostram níveis de resistência elevados contra várias classes de antifúngicos, nomeadamente azóis e polienos (Pierce *et al.*, 2008), uma vez que são capazes de suportar concentrações antifúngicas 1000 vezes superiores às que inibem células planctónicas (Taff *et al.*, 2013).

Os mecanismos associados a esta resistência são o aumento da actividade de bombas de efluxo, mutações em genes que codificam enzimas-alvo de antifúngicos como *ERG11* e a presença de uma matriz extracelular (Mathé e Dijck, 2013; Taff *et al.*, 2013; Chandra e Mukherjee, 2015; Prasad *et al.*, 2015).

A incapacidade de acumular concentrações prejudiciais de antifúngico é atribuída principalmente às proteínas de efluxo *ATP binding cassette* (ABC) e a *major facilitator superfamily* (MFS), que são sobreexpressas em isolados fúngicos resistentes. Entre os transportadores ABC, as proteínas Cdr1 e Cdr2 são aquelas com maiores implicações clínicas e a Cdr1 é o principal determinante da resistência aos azóis (Prasad *et al.*, 2015).

Mutações no gene *ERG11* levam a alterações na sequência de aminoácidos e na conformação da proteína 14- α desmetilase, essencial para a síntese de ergosterol. Como consequência, a afinidade entre os azóis e a enzima alvo pode diminuir levando à resistência de azóis (Xu *et al.*, 2015).

As células dentro do biofilme de *C. albicans* estão incorporadas numa matriz extracelular. A quantidade de material de matriz presente depende das condições de crescimento a que o biofilme é submetido, sendo produzido muito mais material quando as células são confrontadas com um fluxo líquido em comparação com condições estáticas. Um potencial mecanismo pelo qual a matriz aumenta a resistência do biofilme é através da permeabilidade reduzida dos antifúngicos através do biofilme (Mathé e Dijck, 2013). Nett *et al.* (2007) descobriram que as paredes celulares das células associadas ao biofilme eram até duas vezes mais espessas e continham mais hidratos de carbono e β -1,3-glucanos do que as estacionárias, podendo ligar-se quatro a cinco vezes mais fluconazol por peso de parede celular em comparação com as células planctónicas. Os β -1,3-glucanos contribuem também para a resistência aos azóis de espécies de *Candida* não-*albicans* (Mitchell *et al.*, 2013).

A capacidade de *Candida* para formar biofilmes resistentes aos antifúngicos é um importante factor na contribuição para a doença humana (Sardi *et al.*, 2013).

1.3. Antifúngicos

As classes de agentes antifúngicos mais usadas para o tratamento de infecções causadas por *Candida* são os azóis, polienos e equinocandinas (Mandras *et al.*, 2016).

Os azóis são comumente utilizados para o tratamento de infecções causadas por *Candida*, e a *Infectious Diseases Society of America* (IDSA) recomenda-os como um tratamento primário para candidemia em pacientes não neutropênicos (Sanglard e Coste, 2016). O fluconazol é o agente antifúngico mais usado, mas o voriconazol também tem actividade contra *Candida*, sendo este reservado para casos de resistência (Arendrup, 2013).

Os azóis são uma classe de compostos sintéticos que possuem um ou mais anéis azol (Shalini *et al.*, 2011). Os azóis são usados para o tratamento de micoses humanas, sendo que os triazóis são usados correntemente em infecções fúngicas invasivas (Egbuta, Lo e Ghosh, 2014; Freitas e Frade, 2014).

Quanto ao modo de acção, os azóis são antifúngicos que inibem algumas isoenzimas do citocromo P450 das mitocôndrias fúngicas. O alvo principal é a enzima 14 α desmetilase (Figura 4), responsável pela transformação do lanosterol em ergosterol (Egbuta, Lo e Ghosh, 2014; Freitas e Frade, 2014). O ergosterol é um componente essencial da membrana citoplasmática fúngica e a sua inibição resulta no aumento da permeabilidade e instabilidade da membrana citoplasmática, inibindo o crescimento da célula (Esquivel *et al.*, 2015; Sanglard e Coste, 2016).

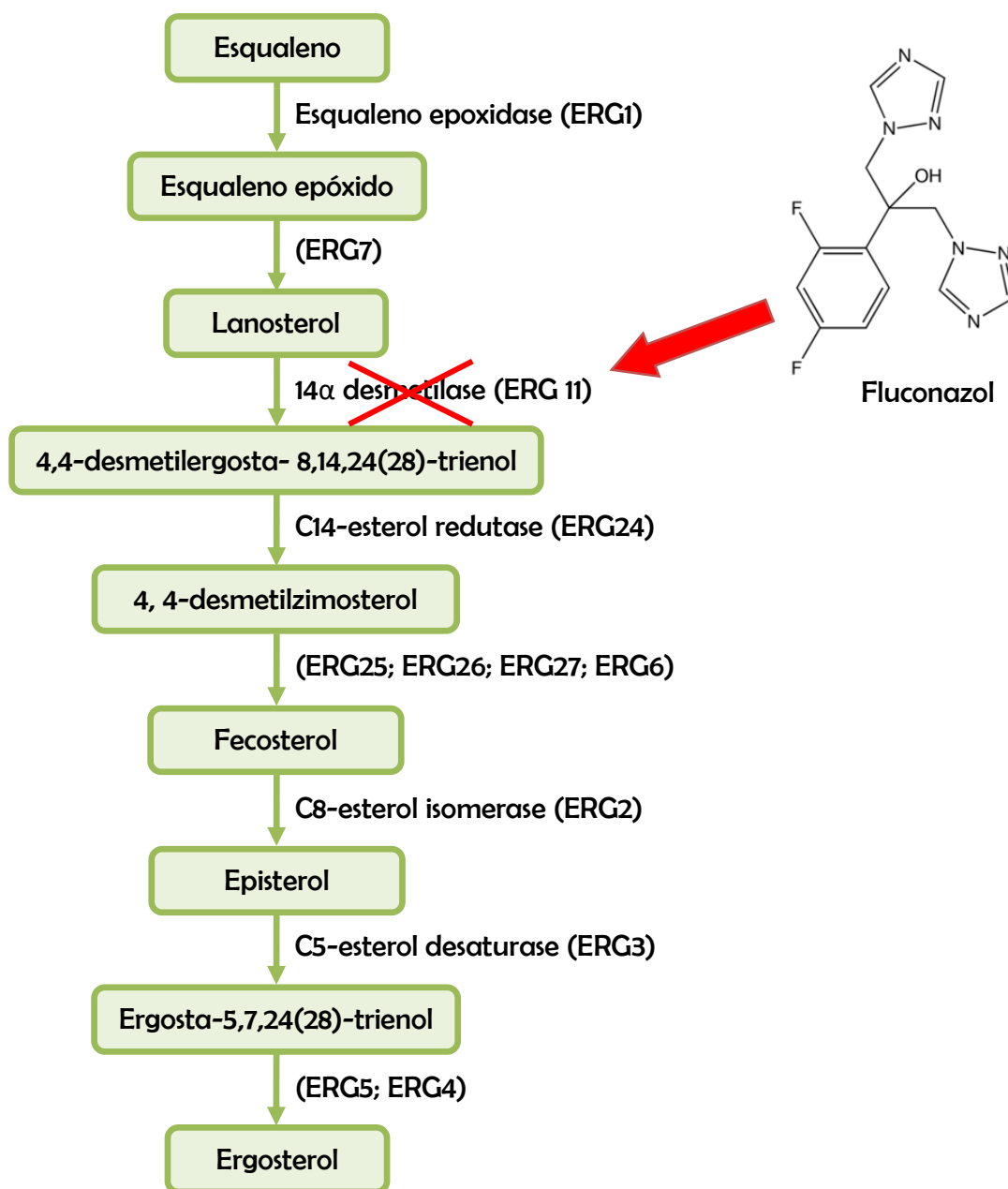


Figura 4. Esquema síntese do mecanismo de acção de um azol (fluconazol) sobre a enzima 14 α desmetilase (ERG11) impedindo a conversão de lanosterol em 4,4-desmetilergosta- 8,14,24(28)-trienol, impedindo a formação do composto final: ergosterol (adaptado de Baumann *et al.*, 2011)

Os azóis são, na maioria dos casos, agentes fungistáticos, pois causam inibição parcial do crescimento das células fúngicas (Sanglard e Coste, 2016; Freitas e Frade, 2014; Arendrup, 2013). As propriedades farmacológicas, o espectro de acção e, em especial, as menores interações com os citocromos P450 humanos separam os imidazóis dos triazóis (mais recentes). Com efeito, os triazóis são menos susceptíveis a

degradação metabólica, têm maior especificidade de alvo, ou seja, maior afinidade para as membranas fúngicas do que para as membranas dos mamíferos, sendo muito melhor tolerados, têm potência aumentada e um espectro de actividade largo (Shalini *et al.*, 2011; Freitas e Frade, 2014).

A gestão de infecções por *Candida* enfrenta vários problemas como toxicidade, resistência aos antifúngicos, reincidência de infecções e o custo elevado dos medicamentos antifúngicos. Para contornar estes problemas têm sido exploradas estratégias terapêuticas alternativas, como o uso de produtos naturais (Mandras *et al.*, 2016).

1.3.1. Fluconazol

O fluconazol (Figura 5) é um composto sintético bi-triazolado, dotado de hidrossolubilidade, que tem sido usado para o tratamento de infecções por *Candida*, *Cryptococcus* e outras leveduras oportunistas desde 1990 (Pfaller *et al.*, 2006; Shalini *et al.*, 2011; Freitas e Frade, 2014).

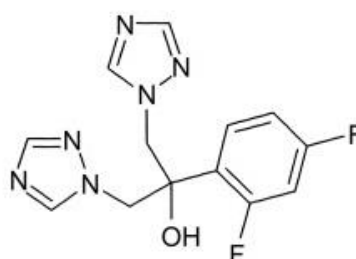


Figura 5. Estrutura molecular do fluconazol (adaptado de Warrilow *et al.*, 2014)

Ao contrário do que acontece com a maioria dos outros azóis, a ligação do fluconazol às proteínas é fraca (11-12%) permitindo a circulação de elevadas concentrações de antifúngico livre por todos os órgãos e tecidos (Pfaller *et al.*, 2006; Freitas e Frade, 2014).

De um modo geral, o fluconazol é bem tolerado. As anomalias da função hepática (mais comuns), a verificarem-se, são transitórias, assim como a insuficiência das glândulas suprarrenais (Egunsola *et al.*, 2013; Freitas e Frade, 2014).

A resistência de *Candida* spp. ao fluconazol tem sido observada especialmente em doentes neutropénicos tratados para formas invasivas de candidose. Nos indivíduos

infectados por vírus da imunodeficiência humana com candidoses orais pode acontecer a substituição de espécies habitualmente sensíveis ao fluconazol por espécies intrinsecamente resistentes ou de sensibilidade diminuída, como *C. krusei* e *C. glabrata* (Pfaller *et al.*, 2006; Freitas e Frade, 2014).

Vários estudos sugerem que pode ocorrer uma resistência cruzada com fluconazol e outros azóis. O mecanismo base para esta resistência cruzada tem sido demonstrado em vários estudos e envolve a sobreexpressão dos genes que codificam para transportadores de efluxo *ATP binding cassette*, chamadas bombas CDR (*Candida* Drug Resistance). Isolados de *Candida* spp. com Concentrações Mínimas Inibitórias (CMI) elevadas ao fluconazol tendem a ser menos susceptíveis ao itraconazol, posaconazol, ravuconazol e voriconazol, como *C. glabrata* (Pfaller *et al.*, 2006). *Candida krusei*, que tem uma resistência intrínseca ao fluconazol, é susceptível ao voriconazol (Sanglard e Coste, 2016).

1.3.2. Voriconazol

O voriconazol (Figura 6) é um triazol sintético de 2ª geração derivado do fluconazol, indicado no tratamento primário de paciente imunocomprometidos com infecções fúngicas graves (Scott e Simpson, 2007; Freitas e Frade, 2014). Tem um largo espectro de acção com acção comprovada contra *Aspergillus* e *Candida*. Tem acção fungicida contra certos fungos oportunistas, no entanto, é essencialmente fungistático sobre a maioria dos fungos leveduriformes (Freitas e Frade, 2014; Marks *et al.*, 2017). É também activo sobre espécies de *Candida* com resistência natural (*C. glabrata* e *C. krusei*) ou adquirida (*C. albicans*) ao fluconazol (Freitas e Frade, 2014; Malani *et al.*, 2015).

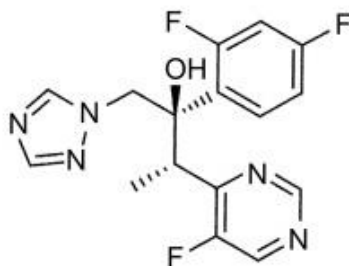


Figura 6. Estrutura molecular do voriconazol (adaptado de Warrilow *et al.*, 2014)

A resistência adquirida ao voriconazol é rara, mas, quando acontece, é observada especialmente em isolados de *C. albicans* provenientes de doentes imunocomprometidos com episódios repetitivos de candidose orofaríngea ou esofágica (Freitas e Frade, 2014; Widerhold e Patterson, 2015). Também alguns isolados de *C. glabrata*, *C. krusei* e *C. guilliermondii*, resistentes ao fluconazol e/ou itraconazol, têm exibido resistência cruzada ao voriconazol (Freitas e Frade, 2014).

A utilização do voriconazol apresenta alguns riscos adversos, tais como, hepatotoxicidade e neurotoxicidade em tratamentos prolongados. Nestes casos, deve ser feita a monitorização do doente como mecanismo para otimizar tanto a eficácia como a segurança. No entanto, geralmente, este antifúngico é um medicamento bem tolerado (Elewa *et al.*, 2015).

1.4. Compostos naturais

Existe um número razoável de agentes antifúngicos actualmente no mercado farmacêutico. Alguns destes agentes já são usados há muito tempo, juntamente com alguns derivados menos tóxicos. No entanto, os alvos celulares destes agentes são limitados devido à grande semelhança entre as células fúngicas e humanas, isto é, ambos são organismos eucariotas, o que representa um dos maiores desafios no desenvolvimento de fármacos eficientes com nenhuma ou baixa toxicidade para o hospedeiro (Martinez-Rossi *et al.*, 2008). Os efeitos adversos da terapia antifúngica convencional e o aumento da resistência antimicrobiana manifestam uma urgência na procura de medicamentos alternativos capazes de controlar as infecções fúngicas (Curvelo *et al.*, 2014; Seleem *et al.*, 2016).

Os compostos provenientes de fontes botânicas têm ganho atenção na última década porque exibem uma diversidade estrutural e singularidade em modos de acção funcionais, que os torna candidatos atraentes para contrariar a emergência de resistências antifúngicas por parte de *Candida* (Seleem *et al.*, 2016). Os compostos naturais são reconhecidos como alternativas potencialmente mais seguras e promissoras aos agentes sintéticos (Shweta *et al.*, 2016).

Os óleos essenciais são líquidos aromáticos e voláteis naturais extraídos dos materiais das plantas (flores, raízes, cascas, folhas, sementes, frutas e plantas inteiras). Alguns destes óleos têm sido estudados, apresentando alguns deles propriedades antimicrobianas significativas. São misturas complexas com mais de 45 constituintes e a sua composição pode mudar consoante a estação de colheita e os métodos usados para a extração, sendo por isso difícil identificar qual o composto individual com maior actividade antimicrobiana. Os óleos essenciais ou os seus componentes exibem propriedades antibacterianas de largo espectro, antiparasíticas, insectidas, antifúngicas, antivirais e antioxidantes (Hyldgaard *et al.*, 2012; Curvelo *et al.*, 2014).

Os químicos nos óleos essenciais são metabolitos secundários importantes na defesa das plantas (Hyldgaard *et al.*, 2012).

A certas concentrações, os óleos essenciais podem ser selectivos contra agentes patogénicos sem afectarem as bactérias intestinais comensais benéficas. Por exemplo, o óleo de timol consegue erradicar *Clostridium perfringens* sem afectar espécies de *Lactobacillus* (Seow *et al.*, 2014).

A maioria dos estudos relativos ao modo de acção antimicrobiano dos constituintes dos óleos essenciais tem sido feita em bactérias e menos é conhecido sobre o modo de acção em fungos, incluindo leveduras (Hyldgaard *et al.*, 2012).

Uma característica dos óleos essenciais é a sua hidrofobicidade, tendo a capacidade de reagir com os lípidos da membrana celular bacteriana. Pinto *et al.* (2009) reportou que o óleo essencial de alho resultou numa lesão extensiva da membrana celular fúngica. Também foi observada uma redução considerável da quantidade de ergosterol (Seow *et al.*, 2014).

De longe, os compostos mais activos são os fenóis. Os óleos essenciais que exibem actividade antimicrobiana mais potente contra agentes patogénicos possuem uma quantidade elevada de compostos fenólicos, tais como o timol e carvacrol do orégão e o eugenol do alho (Seow *et al.*, 2014).

Os constituintes dos óleos essenciais são uma família diversa de compostos orgânicos de baixo peso molecular com grandes diferenças na actividade antimicrobiana. Os compostos activos podem ser divididos em 4 grupos de acordo com a sua estrutura molecular: terpenos, terpenóides, fenilpropenos e "outros" (Hyldgaard *et al.*, 2012).

Os terpenos são hidrocarbonetos produzidos da combinação de várias unidades de isoprene (C_5H_8). São sintetizados no citoplasma da parede das plantas, e a síntese procede via ácido mevalónico começando na acetilCoA. Os principais terpenos são os monoterpenos (C_{10}) e os sesquiterpenos (C_{15}), mas existem cadeias mais longas. Exemplos de terpenos são o p-cymeno, limoneno, terpine, sabinene e pineno (α -pineno e β -pineno) (Hyldgaard *et al.*, 2012).

Os terpenos não representam um grupo com grande actividade antimicrobiana quando aplicados como compostos singulares (Hyldgaard *et al.*, 2012).

Os terpenóides são terpenos que sofreram modificações bioquímicas via enzimática, que adicionam moléculas de oxigénio e movem ou removem grupos metilo. Todos estes compostos possuem actividade antifúngica. Exemplos de terpenóides são o timol, carvacrol, linalool, acetato de linalilo, citronelal, piperione, mentol e geraniol (Hyldgaard *et al.*, 2012; Shweta *et al.*, 2016).

A actividade antimicrobiana da maioria dos terpenóides está ligada aos seus grupos funcionais. O grupo hidroxilo ligado a um benzeno e a presença de electrões deslocalizados são importantes para a actividade antimicrobiana. Quando o grupo hidroxilo é trocado por outro grupo funcional a hidrofobicidade, actividade antimicrobiana e a maneira como a molécula interage com a membrana são alteradas. Por exemplo, a actividade antimicrobiana dos derivados do carvacrol, éter metílico de carvacrol e p-cymene, são muito mais baixas do que do carvacrol (Hyldgaard *et al.*, 2012; Gallucci *et al.*, 2014).

Os terpenóides são um grande grupo de compostos antimicrobianos activos contra um largo espectro de microrganismos, com os monoterpenóides mais ativos identificados até agora sendo o carvacrol e o timol (Hyldgaard *et al.*, 2012). Dorman e Deans (2000) investigaram os efeitos de terpenóides contra 25 espécies bacterianas diferentes e, à excepção do borneol e do éter metílico de carvacrol, todos exibiram ampla actividade microbiana. Os compostos mais activos foram o timol seguido do carvacrol.

Os fenilpropenos são fenilpropanóides voláteis derivados do precursor de aminoácidos fenilalanina em plantas (Atkinson, 2017). Os fenilpropenos constituem uma parte relativamente pequena de óleos essenciais, e aqueles que foram mais

estudados de perto são o eugenol, isoeugenol, vanilina, safrole e cinamaldeído (Hyldgaard *et al.*, 2012).

Os fenilpropenos atraíram vários investigadores pois são o principal constituinte de especiarias importantes como o Cravo-da-Índia (*Eugenia caryophyllata*) e estrela-de-anis (*Illicium verum*) e de ervas aromáticas como o manjeriço (*Ocimum basilicum*) e erva-doce (*Foeniculum vulgare*) (Atkinson, 2017).

A actividade antimicrobiana de fenilpropenos depende do tipo e número de substituintes no anel aromático, estirpes microbianas e dos parâmetros de testes experimentais, como escolha do meio de cultura e a temperatura. (Hyldgaard *et al.*, 2012).

"Outros" constituintes dos óleos essenciais são, por exemplo, compostos que contêm enxofre e azoto com actividade antimicrobiana conhecida, como alicina e isotiocianato de alilo (Hyldgaard *et al.*, 2012).

A alicina é um composto orgânico, derivado principalmente do alho, que contém enxofre. Quando o alho é esmagado, a aliina, que existe naturalmente no alho, reage com a enzima alinase. A alinase actua como um catalisador e transforma a aliina em alicina. Vários estudos já demonstraram que alicina pura tem fortes propriedades antibacterianas e antifúngicas, incluindo acção contra biofilmes de *C. albicans*. No entanto, a alicina tem uma aplicação clínica limitada devido à sua elevada CMI, sendo usada principalmente como um agente suplementar para aumentar a eficácia de agentes químicos (Kim *et al.*, 2012).

Os isotiocianatos, também conhecidos como óleos de mostarda, são óleos essenciais comuns de plantas que pertencem à família Cruciferae, como a mostarda, bróculos, rábano, couve e nabo. São compostos sintetizados a partir de glucosinolatos através da acção hidrolítica da enzima mirosinase presente nas plantas (Raut *et al.*, 2017). O isotiocianato de alilo é um isotiocianato não fenólico volátil que tem demonstrado grande actividade bactericida contra vários microrganismos responsáveis pela deterioração de alimentos e de agentes patogénicos, incluindo *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes* e outras bactérias Gram negativos aeróbicas, e ainda contra um grande espectro de fungos (Hyldgaard *et al.*, 2012).

1.4.1. Carvacrol

O carvacrol (Figura 7) é um monoterpenóide fenólico e o principal constituinte do óleo de orégão. É considerado não tóxico para humanos (Chaillot *et al.*, 2015) tendo sido aprovado pela *Federal Drug Administration* (FDA) pelos seus usos na comida e é incluído pelo *Council of Europe* na lista de aromatizantes em vários produtos alimentares (Suntres *et al.*, 2015).

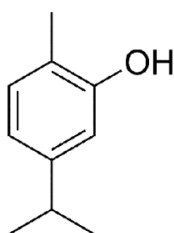


Figura 7. Estrutura molecular do carvacrol (adaptado de Hyldgaard *et al.*, 2012)

Juntamente com o timol, o carvacrol é um dos constituintes dos óleos essenciais mais extensivamente estudados. O carvacrol tem um largo espectro de actividade antimicrobiana contra fungos patogénicos, incluindo leveduras, bactérias e alguns vírus (Hyldgaard *et al.*, 2012).

O efeito antimicrobiano do carvacrol causa danos estruturais e funcionais na membrana celular. Os mecanismos de actividade antifúngica são semelhantes aos do timol, mostrando interrupção da integridade da membrana comprometendo a biossíntese do ergosterol em espécies de *Candida*. (Hyldgaard *et al.*, 2012; Sánchez *et al.*, 2015).

O carvacrol é um dos monoterpenóides mais potentes contra *C. albicans*, impedindo o crescimento das diferentes formas morfológicas incluindo levedura e hifa, e potencialmente quando estes agentes crescem em biofilme (Chaillot *et al.*, 2015).

1.4.2. Timol

O timol é o principal monoterpenóide fenólico que constitui uma variedade de plantas de tomilho, como *Thymus vulgaris* (mais estudada), *Thymus zygis* (variedade espalhada por Portugal e Espanha) e *Thymus citriodorus* (cultivada na região Mediterrânea) (Bermejo *et al.*, 2015).

O timol é muito semelhante ao carvacrol (Figura 8), tendo o grupo hidroxilo numa posição diferente no anel fenólico. A acção antimicrobiana de compostos fenólicos causa danos estruturais e funcionais à membrana citoplasmática. (Hyltdgaard *et al*, 2012).

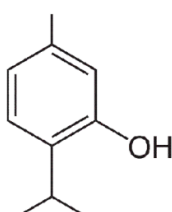


Figura 8. Estrutura molecular do timol (adaptado de Hyltdgaard *et al.*, 2012)

O modo de acção do timol contra fungos e leveduras tem sido escassamente investigado, mas estudos apontam para interacções com o envelope celular e alvos intracelulares. O timol lisa vesículas e membranas celulares, e compromete a biossíntese do ergosterol em espécies de *Candida*, que consequentemente afecta a integridade da membrana celular (Hyltdgaard *et al.*, 2012).

1.4.3. α -pineno

Os pinenos podem ser encontrados nos óleos essenciais de árvores coníferas (pinheiro), alecrim, lavanda e terebentina (Kim *et al.*, 2015). Existem dois isómeros estruturais activos: α - e β -pineno, em que ambos têm enantiómeros conhecidos na natureza como (-)- α -pineno, (+)- α -pineno, (-)- β -pineno e (+)- β -pineno (Figura 9) (Silva *et al.*, 2012).

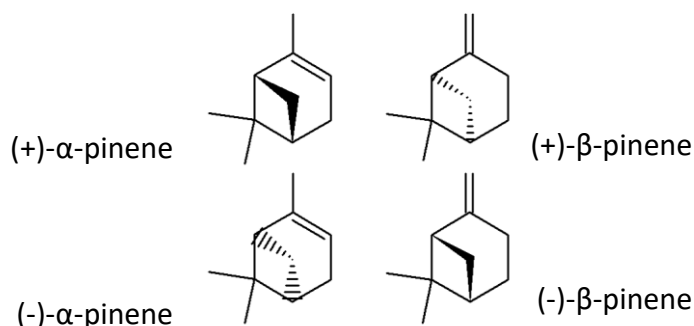


Figura 9. Estrutura molecular dos enantiómeros de α e β -pineno (adaptado de Silva *et al*, 2012)

Nas plantas, os pinenos mostram actividade fungicida.

Segundo um estudo levado a cabo por Silva *et al.* (2012) em que testaram os quatro enantiómeros contra vários microrganismos, entre eles *C. albicans*, reportaram que não foi detectada actividade antimicrobiana por parte dos enantiómeros negativos. Já os enantiómeros positivos mostraram um efeito microbiocida em todos os microrganismos testados. Foi também testada a actividade de (+)- α -pineno e (+)- β -pineno contra biofilmes de *C. albicans* e o desenvolvimento destes biofilmes foi significativamente inferior comparando com os biofilmes controlo formados na ausência destas substâncias.

O α -pineno é um monoterpreno que mostra boa actividade em testes *in vitro* pelo método de diluição em microplaca. Vários estudos destacam a actividade significativa deste composto contra espécies de *Candida* (Silva *et al.*, 2012; Mandras *et al.*, 2016).

1.4.4. Linalool

O linalool (Figura 10) é um composto natural e principal componente volátil dos óleos essenciais de várias plantas aromáticas, como a lavanda, bergamota e o manjeriço, com actividade antifúngica, antibacteriana e propriedades insecticidas (Hsu *et al.*, 2013; Beier *et al.*, 2014; Ma *et al.*, 2015). É levemente volátil, com um aroma associado com a fragrância de lavanda e louro. Esta propriedade tornou-o útil em produtos comerciais tais como agentes aromatizantes, perfumes e cosméticos, e é geralmente reconhecido como seguro (GRAS) pela FDA para estes propósitos (Hsu *et al.*, 2013; Beier *et al.*, 2014).

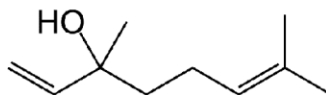


Figura 10. Estrutura molecular do linalool (adaptado de Hyldgaard *et al.*, 2012)

Recentemente foi descoberto que o linalool exerce uma actividade antifúngica por ruptura da integridade da membrana e bloqueando o ciclo celular das células planctónicas de *C. albicans*, inibindo o seu crescimento. Além disso, este composto

previne a formação de biofilmes e reduz os biofilmes de *C. albicans* que tenham sido desenvolvidos por um dia (Hsu *et al.*, 2013).

1.4.5. Citronelal

O citronelal (Figura 11) é um dos princípios constituintes do óleo essencial de citrino (*Cymbopogon*). É um isolado importante de plantas como *Cymbopogon* (cidreira), *Corymbia citridora* (eucalipto-limão) e *Leptospermum petersonii* (Shweta *et al.*, 2016).

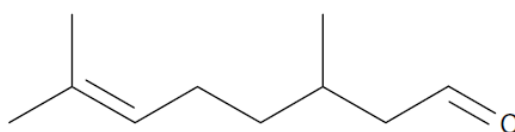


Figura 11. Estrutura molecular do citronelal (adaptado de Nunes *et al.*, 2010)

Estudos mostram a actividade do citronelal contra vários fungos, como *Aspergillus* (Aguiar *et al.*, 2014). No entanto, não existe muita literatura relativa ao uso deste composto em leveduras, mas Cavalcanti *et al.* (2011) relatam actividade antifúngica do óleo essencial de *Cymbopogon winterianus* em estirpes de *Candida*.

Um estudo preliminar mostrou que o citronelal inibe a adesão de *C. albicans* a implantes dentários (Trindade *et al.*, 2015). No entanto, o mecanismo da actividade anti-*Candida* do citronelal ainda é desconhecido (Shweta *et al.*, 2016).

1.4.6. Nerolidol

O nerolidol (Figura 12), também conhecido como peruvicol, é um álcool sesquiterpeno presente em óleos essenciais de plantas com odor floral. É utilizado frequentemente incorporado em cosméticos (p.e. champôs, sabões e perfumes), detergentes e produtos de limpeza. É também utilizado na indústria alimentar como um intensificador de sabor desde que foi aprovado pela FDA como um agente aromatizante alimentar seguro (Chan *et al.*, 2016; Javed *et al.*, 2016).

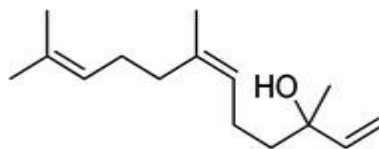


Figura 12. Estrutura molecular do nerolidol (adaptado de Javed *et al.*, 2016)

Tal como os outros compostos sesquiterpenos, o nerolidol tem elevada hidrofobicidade, permitindo uma fácil entrada pela membrana plasmática e interacção com proteínas intracelulares.

O nerolidol tem várias actividades biológicas e farmacológicas como antimicrobiana, antibiofilme, antioxidante, antiparasítica, repelente, anti-inflamatória e anti-cancro. (Chan *et al.*, 2016).

Curvelo *et al.* (2014) sugerem que o *trans*-nerolidol (componente principal extraído das folhas de *Piper clausenianum*) diminui a formação de biofilmes de *C. albicans* em 30% às 24h e em 50% às 48h de incubação.

1.4.7. Eugenol

O eugenol (Figura 13), principal componente do óleo essencial de alho, é um constituinte do grupo dos fenilpropenos com um aroma floral. Este composto é usado como aromatizante e tem actividade antimicrobiana, anestésica, anti-oxidante e anti-inflamatória (He *et al.*, 2007; Grupta *et al.*, 2014).

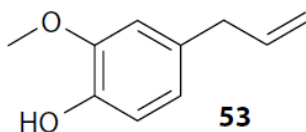


Figura 13. Estrutura molecular do eugenol (adaptado de Sell, 2010)

O eugenol exerce uma actividade antifúngica tendo como alvo a via de biossíntese do ergosterol e tem o potencial de converter a acção fungistática do fluconazol num fármaco fungicida quando usados em combinação (Ahmad *et al.*, 2015).

O efeito antifúngico do eugenol contra *C. albicans* já foi reportado por vários autores (Tampiere *et al.*, 2005; Braga *et al.*, 2007; Pinto *et al.*, 2009) e, num estudo feito por He *et al* (2007) em que foi avaliada a actividade *in vitro* do eugenol em biofilmes pré-formados de *C. albicans*, verificou-se que este composto é também activo contra as células sésseis de biofilmes, com a Concentração Mínima Inibitória que inibe o crescimento em 50% (CMI₅₀) às 48h no valor de 500 mg/L, expondo o seu potencial em terapêutica de infecções fúngicas associadas a biofilmes quando estas infecções são resistentes aos agentes antifúngicos convencionais.

Pinto *et al.* (2009) referem que o eugenol tem actividade antifúngica contra, não apenas espécies de *Candida*, como também outros fungos clinicamente relevantes como espécies de *Aspergillus* e de dermatófitos, incluindo estirpes resistentes ao fluconazol.

1.5. Método de microdiluição para determinação de concentrações mínimas inibitórias de compostos antifúngicos

Os métodos de diluição são usados para estabelecer a concentração mínima inibitória (CMI) dos agentes antimicrobianos. A CMI é definida com a concentração mais baixa, em mg/L, a que um agente antifúngico inibe o crescimento de um fungo a um grau predefinido (p.e. 50%, 80% ou completamente). Esta permite categorizar os fungos em "susceptível" (S), "susceptível dependendo da dose" (SDD) ou "resistente" (R) a um agente antifúngico quando os limites (*breakpoints*) são estabelecidos (Arendrup *et al.*, 2015).

Estes são métodos de referência para testes de susceptibilidade antimicrobiana e são usados para estabelecer: a actividade de novos agentes antifúngicos, confirmar a susceptibilidade de organismos que dêem resultados equívocos noutro formato de testes (tais como testes comerciais) ou onde esses formatos não sejam fiáveis ou que não estejam validados. Em testes de diluição, os fungos são avaliados quanto à sua capacidade de produzir crescimento suficiente em poços de placas de microdiluição com meios de cultura que contenham várias diluições seriadas dos agentes antimicrobianos (Arendrup *et al.*, 2015).

A técnica de microdiluição em microplaca é um método rápido, eficiente, confiável e reprodutível. É mais sensível do que os métodos de difusão em agar e melhor para estabelecer a potência dos compostos. Os testes de diluição permitem também a determinação da CMI correlacionada aos efeitos fungicida e fungistático dos óleos essenciais. Para determinar estes valores são utilizadas a avaliação visual de crescimento e a densidade óptica (turbidez) (Ramage *et al.*, 2001; Palmeira-de-Oliveira *et al.*, 2009).

Relativamente ao crescimento de biofilmes a técnica utilizada envolve a formação de múltiplos biofilmes no fundo dos poços de microplacas acoplada a um método colorimétrico que mede a actividade metabólica de células no biofilme com base na redução do sal de tetrazólio (XTT.) Após o processamento por células metabolicamente activas, o XTT produz um produto colorido solúvel em água que pode ser medido espectrofotometricamente num leitor de microplacas (Pierce *et al.*, 2008; Silva *et al.*, 2008). Devido à sua solubilidade em água não são necessários passos adicionais tais como centrifugação, adição de tampão de lise, solubilização, remoção de meio de cultura e sonicação (Ramage *et al.*, 2001).

Ramage *et al.* (2001) demonstraram que as leituras das absorvâncias da redução do XTT dão uma excelente correlação entre a densidade celular e a actividade metabólica, proporcionando também uma medição semiquantitativa da formação do biofilme. Este método colorimétrico requer um mínimo de pós-processamento das amostras quando comparado com outros métodos, como a contagem de células viáveis. No geral, este método oferece uma alternativa simples, flexível, relativamente barata, precisa e reprodutível para avaliar a formação de biofilmes que é compatível com a grande variedade de plataformas de microplacas de 96 poços (Pierce *et al.*, 2008).

1.6. Métodos usados para o estudo da sinergia entre compostos antifúngicos

Os métodos comuns usados para o estudo de interacções antimicrobianas são difusão em disco, *checkerboard* e curvas tempo-morte (Verma, 2007). Estes métodos são bastante utilizados tanto para combinações de antibióticos como de agentes antifúngicos. Contudo, estes testes estão optimizados para substâncias antimicrobianas

que são geralmente hidrofílicas na natureza. Em contraste, os óleos essenciais são voláteis e insolúveis em água. Uma maneira de providenciar uma melhor difusão dos compostos dos óleos essenciais pelos meios é com o uso de diferentes solventes, como o dimetilsulfóxido (DMSO) (Kon e Rai, 2013).

O método de difusão em disco é de fácil execução e pode ser aplicado na triagem de grande quantidade de combinações. Contudo, em estudos com óleos essenciais este método tem várias limitações como a evaporação do óleo, que pode distorcer significativamente os resultados. Além disso, a taxa de difusão no meio pode diferir significativamente entre os vários óleos essenciais. A comparação de resultados torna-se também difícil com o uso de diferentes volumes e diferentes diluições dos compostos naturais em discos. Este método não é muito utilizado para avaliar a sinergia entre compostos naturais e agentes antifúngicos, à excepção de uma avaliação preliminar (Kon e Rai, 2013).

Mais comum são as microdiluições e especialmente os métodos *checkerboard*, mas também não há concordância entre metodologias em diferentes estudos (Kon e Rai, 2013).

O teste de sinergia *checkerboard* é a técnica padrão mais usada e mais precisa para determinar a actividade de combinações entre agentes antifúngicos e compostos naturais e baseia-se na microdiluição de várias combinações dos dois compostos (Ozseven *et al.*, 2012). As CMI são determinadas para as combinações de todas as concentrações e depois são usadas para o cálculo do índice de Concentração Inibitória Fraccional (CIF), que é igual à soma dos CIF de cada composto (Verma, 2007). São poucas as discrepâncias entre estudos na interpretação dos índices CIF. Enquanto a maioria dos estudos usa a definição de sinergia com índice $CIF \leq 0,5$, antagonismo com índice $CIF \geq 4$, e indiferente para valores entre 0,5 e 4, em outros estudos é feita uma interpretação diferente (Kon e Rai, 2013). Por exemplo, Van Vuuren *et al.* (2009) e Van Zyla *et al.* (2010) definem $CIF < 1$ como sinergia, $CIF > 1$ como antagonista e $CIF = 1$ como indiferente. Mahboudi e Ghazian Bidgoli (2010) definem sinergia como $CIF \leq 0,5$, antagonista como $CIF > 2$ e indiferente entre estes valores.

Esta técnica é normalmente usada em vários estudos, mas apresenta algumas limitações, como o facto que não testa a actividade microbiciada dos compostos em estudo. Outras limitações são o cálculo dos índices CIF, que assumem uma curva dose-

resposta linear para todos os agentes antimicrobianos, e fornece uma visão estática da interacção de antimicrobianos uma vez que os resultados são examinados apenas num intervalo de tempo (Verma, 2007).

Com o método clássico de curvas tempo-morte é possível estudar interacções dependentes do tempo entre compostos em várias combinações. Depois de uma estirpe incubar em meios de cultura com e sem os compostos em estudo, em várias combinações, é feita uma contagem de células após um intervalo de tempo definido. No entanto, este método é o mais moroso e laborioso (Kon e Rai, 2013).

Existe também um novo método baseado nas tiras *E-test* para avaliar o efeito das combinações de compostos, que traz vantagens às rotinas laboratoriais como o facto de ser fácil de executar (Orhan *et al.*, 2005). Este é um método menos trabalhoso e consome menos tempo, comparando com os métodos clássicos (p.e. *checkerboard*), mas apresenta também desvantagens como o preço elevado e a fiabilidade dos seus resultados (Orhan *et al.*, 2005; Soltani *et al.*, 2012).

1.7. Objectivos do trabalho e plano de dissertação

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Micologia no Instituto de Higiene e Medicina Tropical, da Universidade Nova de Lisboa, e teve como objectivos:

- Avaliar a actividade antifúngica de uma selecção de compostos naturais em várias estirpes de *Candida*;
- Estudar a sinergia entre agentes antifúngicos tradicionais com compostos naturais seleccionados;
- Avaliar a eficácia de compostos naturais seleccionados, isoladamente e em combinação com agentes antifúngicos tradicionais, na inibição *in vitro* de biofilmes de *Candida*.

Esta dissertação encontra-se dividida em quatro capítulos.

No primeiro capítulo é feita uma introdução sobre as leveduras do género *Candida* com maior importância em meio hospitalar, com realce para *C. albicans*. São mencionados os seus mecanismos de infecção, os seus factores de virulência e a sua resistência a agentes antifúngicos convencionais. Neste capítulo são ainda introduzidos os compostos naturais seleccionados para este trabalho tendo em conta resultados previamente publicados.

No segundo capítulo são descritos os métodos utilizados em cada fase deste trabalho, nomeadamente a determinação das CMI, para o estudo da sinergia entre agentes antifúngicos e compostos naturais, inibição *in vitro* de biofilmes, e a forma de interpretação dos resultados.

No terceiro capítulo são apresentados os resultados obtidos neste estudo.

No quarto , e último, capítulo é feita uma discussão dos resultados obtidos e apresentadas as respectivas conclusões.

MATERIAIS E MÉTODOS

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Reagentes e soluções

2.1.1. Compostos naturais

Os compostos carvacrol (99%), (+/-)- α -pineno (98%), linalool (97%), (+/-)-citronellal ($\geq 95\%$), (+/-)-nerolidol (98%) e eugenol (99%) líquidos, e timol ($\geq 99\%$) em pó, foram adquiridos através da empresa Sigma-Aldrich (referências nº W224511, 147524, L2602, 27470, H59605, E51791 e T0501, respectivamente) e armazenados a 4°C.

Soluções concentradas de todos os compostos naturais foram preparadas em dimetilsulfóxido (DMSO), numa concentração 100× superior à concentração mais elevada a ser testada para determinação das CMI (Tabela 2), e armazenadas a -70°C até serem utilizadas.

Tabela 2. Compostos naturais em estudo com respectivas gamas de concentração a serem testadas para a determinação da CMI e concentração das soluções concentradas (soluções *stock*)

Composto natural	Gama de concentração (mg/L)	[Solução <i>stock</i>] (mg/L)
Carvacrol	0,5-256	25600
(+/-)- α -pineno	0,5-256	25600
Linalool	0,5-256	25600
(+/-)-citronelal	0,5-256	25600
(+/-)-nerolidol	0,5-256	25600
Eugenol	0,5-256	25600
Timol	0,5-256	25600

2.1.2. Compostos antifúngicos

Os antifúngicos fluconazol e voriconazol em pó ($\geq 98\%$, HPLC), foram adquiridos através da empresa Sigma-Aldrich (referências nº F8929 e PZ0005, respectivamente).

As soluções concentradas (*stock*) de antifúngicos foram preparadas em DMSO, numa concentração 100× superior à concentração mais elevada a ser testada para determinação das CMI (Tabela 3), e armazenadas a -70°C até serem utilizadas.

Tabela 3. Agentes antifúngicos em estudo com respectivas gamas de concentração a serem testadas para determinação das CMI e concentração das soluções concentradas (soluções *stock*)

Agente antifúngico	Gama de concentração (mg/L)	[Solução <i>stock</i>] (mg/L)
Fluconazol	0,125-64	6400
Voriconazol	0,008-4	400

2.1.3. XTT e menadiona

O XTT e a menadiona foram adquiridos através da empresa Sigma-Aldrich (referências nº X4251 e M5625, respectivamente).

Foi preparada uma solução concentrada de 30 mL de XTT a 0,5 g/L em Tampão Fosfato Salino (PBS). A solução foi filtrada com recurso a filtros com poros de 0,22 μm ("Whatman") e distribuída em alíquotas de trabalho de 10 mL. Os tubos foram envolvidos em folhas de alumínio para prevenir a exposição à luz e armazenados a -70°C .

Relativamente à menadiona, foi preparada uma solução concentrada de 500 μL a 10 mM em 100% de acetona, que, posteriormente, foi distribuída em alíquotas de 50 μL e armazenadas a -70°C .

2.2. Origem das estirpes em estudo

Foram seleccionadas 9 estirpes de *Candida* da colecção de leveduras do Instituto de Higiene e Medicina Tropical da Universidade Nova de Lisboa (IHMT-UNL) que incluem *Candida albicans* (ATCC 90028), *Candida parapsilosis* (246/11; 59/13; CAN260), *Candida glabrata* (531/14; 50/14), *Candida krusei* (5/11; 282/04) e *Candida guilliermondii* (112/13). Foi também utilizada uma estirpe adicional de *Candida albicans* (SER7) com resistência ao fluconazol, proveniente da colecção de leveduras da Micoteca do Centro de Biologia Molecular e Ambiental da Universidade do Minho.

2.3. Meios de cultura

2.3.1. *Potato Dextrose Agar*

O meio *Potato Dextrose Agar* (PDA) é um meio nutritivo não selectivo à base de infusão de batata, glucose e agar indicado pelo (*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*) EUCAST para crescimento de leveduras.

Para este protocolo o meio de PDA (Difco) foi preparado conforme as instruções do fabricante. Posteriormente o meio foi esterilizado em autoclave e armazenado a uma temperatura de 4°C.

2.3.2. Meio RPMI-1640

O meio RPMI-1640 com L-glutamina e sem bicarbonato de sódio, suplementado com 0,2% de glucose, foi adquirido através da empresa Sigma-Aldrich (referência nº R6504-10L) e armazenado a 4°C até utilização. Este é o meio indicado pela EUCAST para determinação das CMI pelo método de microdiluição, mas suplementado adicionalmente com 2% de glucose (em vez de 0,2% de glucose).

Para o protocolo, o meio foi preparado numa solução contendo 10,4g RPMI-1640 (0,2% de glucose), 34,5g de ácido 3-(N-morfolino) propanosulfónico (MOPS), 18g de glucose e feito o acerto a pH 7, de maneira a obter uma solução final de RPMI-1640 2×(com 2% de glucose). O meio será convertido à sua concentração de trabalho

com uma diluição 1:1 quando o inóculo for adicionado. A esterilização do meio foi feita por filtração com recurso a filtro de 0,22 µm (Whatman). Posteriormente o meio foi armazenado a uma temperatura de 4°C.

2.3.3. Sabouraud Dextrose Broth

O meio *Sabouraud Dextrose Broth* (SDB) é um meio líquido utilizado para o crescimento de fungos e leveduras.

Para este protocolo o meio SDB foi preparado conforme as instruções do fabricante (Difco). Posteriormente o meio foi esterilizado em autoclave e armazenado a uma temperatura de 4°C.

2.4. Ensaios antimicrobianos

2.4.1. Determinação da susceptibilidade de *Candida* aos compostos naturais e agentes antifúngicos

A actividade antimicrobiana de cada composto natural e dos agentes antifúngicos foi determinada utilizando o método de microdiluição em microplacas de 96 poços de acordo com as normas EUCAST para leveduras (Arendrup, 2015).

A CMI dos compostos testados corresponde à concentração mais baixa que inibe o crescimento das culturas de leveduras num determinado período de incubação. Neste trabalho foi determinada a CMI que inibe o crescimento em 50% (CMI₅₀) e em 80% (CMI₈₀) quando comparado com um controlo correspondente a uma cultura em que não é adicionado qualquer agente antimicrobiano.

A gama de concentrações testada foi: para o fluconazol 0,125 - 64 mg/L; para o voriconazol 0,008 - 4mg/L; e para os compostos naturais 0,5 - 256mg/L (Tabelas 2 e 3).

Numa fase inicial, a CMI para todos os compostos foi apenas determinada para a estirpe *C. albicans* ATCC 90028, visando fazer uma selecção inicial dos compostos naturais que sugerem maior interesse de estudo. Os compostos com maior actividade antifúngica foram assim seleccionados e testados com as restantes estirpes de *Candida* para determinação das CMI de cada um.

Preparação das microplacas

Para a preparação do gradiente de concentrações de cada composto antifúngico individual em estudo foram diluídos 20 μ L de solução *stock* em 980 μ L de meio RPMI-1640 2%G (2 \times) (diluição 1:50 - denominada Diluição 1). A seguir, foram feitas diluições seriadas de 1:2 em meio RPMI-1640 2%G (2 \times) a partir da Diluição 1, de acordo com o esquema da Figura 14.

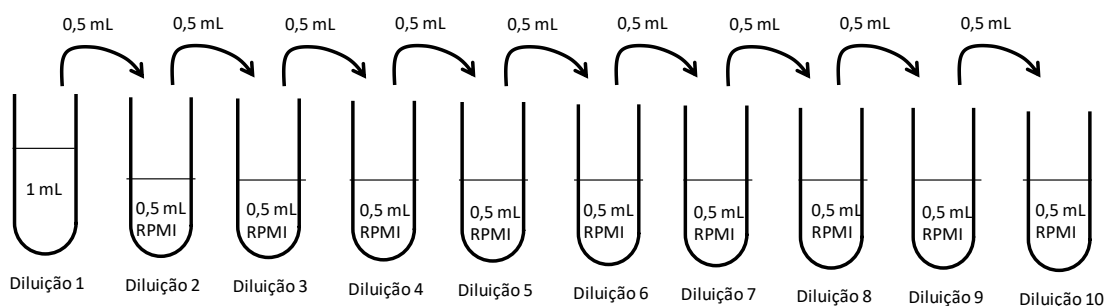


Figura 14. Esquema de diluições seriadas utilizadas para preparar a gama de concentrações de composto natural/agente antifúngico em meio RPMI-1640 2%G (2 \times)

Cada composto (2 agentes antifúngicos + 7 compostos naturais) foi testado em triplicado.

Foram adicionados 100 μ L da Diluição 1 em três poços da coluna 1 da microplaca, 100 μ L da Diluição 2 em três poços da coluna 2 e assim sucessivamente até à Diluição 10 (coluna 10) (Figura 15). Aos poços das colunas 11 e 12 foram adicionados 100 μ L de meio RPMI-1640 2%G (2 \times).

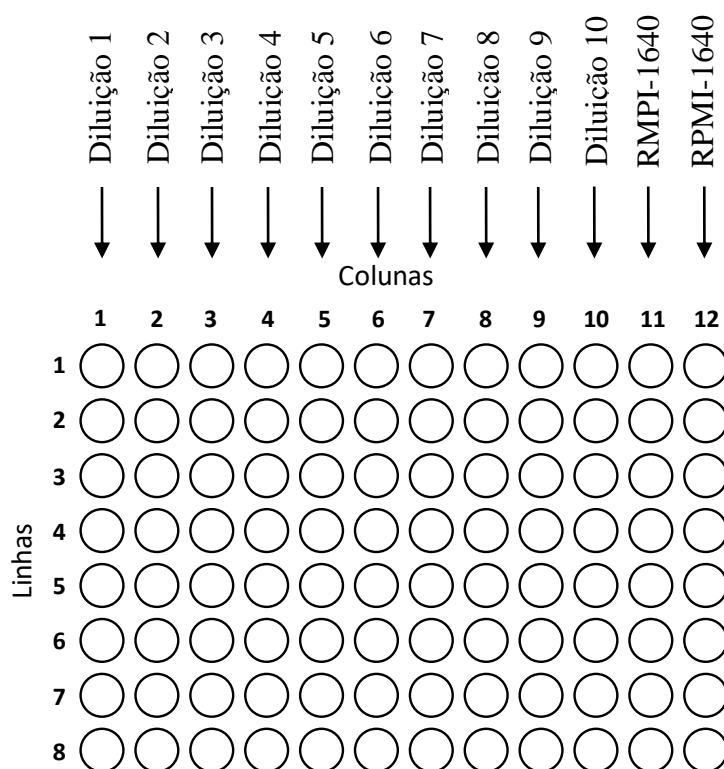


Figura 15. Esquema geral de distribuição das soluções de trabalho dos compostos naturais e antifúngicos (colunas 1-10) e meio RPMI-1640 2%G (2×) (para controlos positivo e negativo) pelos poços da microplaca.

O mesmo procedimento descrito no parágrafo anterior foi feito para o DMSO, que serve como controlo de inibição por este composto ter sido usado na dissolução dos agentes antimicrobianos.

As microplacas depois de preparadas foram seladas em folhas de alumínio e armazenadas a -20°C até à inoculação.

Preparação do inóculo

Os inóculos das culturas de leveduras foram preparados suspendendo cinco colónias (<1mm de diâmetro), a partir de uma cultura incubada nas 24h anteriores em meio PDA a 35°C, em pelo menos 3mL de água destilada estéril de forma a obter uma suspensão inicial com uma turbidez 0,5 na escala de McFarland ($\approx 5 \times 10^6$ UFC/mL). Esta suspensão inicial foi diluída 1:10 em água destilada estéril de forma a obter o inóculo final de trabalho.

Inoculação das microplacas

As microplacas foram inoculadas no máximo até 30 minutos após a preparação do inóculo final. Depois de bem agitado, foram adicionados 100 µL de inóculo a cada poço das colunas 1-11 da microplaca (coluna 11 - controlo positivo) (a concentração celular de cada poço será assim na gama $0,5-2,5 \times 10^5$ UFC/mL). Aos poços da coluna 12 das microplacas foram adicionados 100 µL de água destilada estéril (controlo de esterilidade).

As placas foram incubadas a 35°C durante 24h, sem agitação.

Leitura das microplacas

A leitura das absorvâncias das placas de microdiluição foi feita com recurso ao leitor de microplacas The Synergy™ HT Multi-Detection Microplate Reader (BioTek Instruments, Winooski, VT) no comprimento de onda de 530 nm. O valor do branco (coluna 12) foi deduzido aos valores das absorvâncias.

Quando os valores de absorvância foram inferiores a 0,2 no controlo positivo (coluna 11), o que corresponde a um crescimento muito fraco, as placas foram incubadas por mais 24h e feita nova leitura.

A CMI foi definida como a concentração mais baixa que inibe o crescimento em 50% (CMI₅₀) em comparação com o crescimento do controlo positivo (aferido pelos valores das absorvâncias). Foi também definida a CMI₈₀ em que há uma diminuição de 80% do crescimento comparativamente ao crescimento controlo.

A classificação da sensibilidade das estirpes em relação aos agentes antifúngicos foi feita com recurso a tabelas de interpretação das CMI disponibilizadas pela EUCAST (versão 8.1) específicas para *Candida*. As classificações foram feitas relativamente às CMI₅₀, quando há uma inibição de 50% de crescimento medido espectrofotometricamente, tal como indicado pelas normas das tabelas EUCAST.

2.4.2. Sinergia entre compostos naturais e agentes antifúngicos

Foi avaliado se a actividade antimicrobiana dos agentes antifúngicos melhorava por sinergia quando misturados com os compostos naturais.

Foram testadas quatro estirpes de *Candida* nesta fase: *C. albicans* SER7, *C. parapsilosis* 246/11, *C. krusei* 5/11, *C. glabrata* 531/14. Foram testados três compostos naturais (carvacrol, timol e eugenol) em combinação com dois agentes antifúngicos (fluconazol e voriconazol).

A actividade antimicrobiana de cada combinação composto natural e agente antifúngico foi determinada utilizando o método de microdiluição de acordo com as normas EUCAST para leveduras. As combinações foram as seguintes: fluconazol/carvacrol, fluconazol/timol, fluconazol/eugenol, voriconazol/carvacrol, voriconazol/timol e voriconazol/eugenol.

A gama de concentrações testada foi: para o fluconazol 0,125 - 64 mg/L, para o voriconazol 0,008 - 4 mg/L; e para os compostos naturais 2 - 256 mg/L.

Preparação das microplacas

A partir das soluções *stock* foram preparadas soluções de trabalho 4× mais concentradas que a gama de concentrações a ser testada, em RPMI-1640 2%G (2×), tanto para os agentes antifúngicos como para os compostos naturais.

Cada combinação foi testada em duplicado. Nas microplacas o gradiente de concentrações de fluconazol e voriconazol é por coluna; e de carvacrol, timol e eugenol por linha.

As soluções de trabalho dos agentes antifúngicos foram distribuídas nas respectivas colunas das microplacas de 1 a 10 (de maior concentração para a menor concentração), 50µL por poço. Do mesmo modo se distribuiu 50 µL das soluções de trabalho de cada composto natural por cada linha da microplaca de 1 a 8, como indicado no esquema da Figura 16. Nas colunas 11 (controlo positivo) e 12 (controlo negativo) foram distribuídos 100 µL de RPMI-1640 2%G (2×).

As microplacas depois de preparadas foram seladas em folhas de alumínio e armazenadas a -20°C até à inoculação.

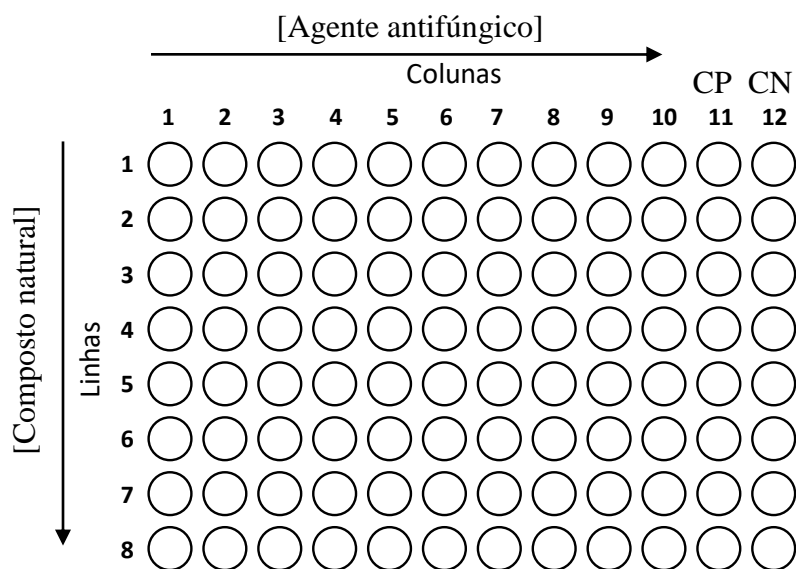


Figura 16. Esquema geral de distribuição das soluções de trabalho de agente antifúngico vs composto natural pela microplaca (colunas 1-10). CP - Controlo positivo; CN - Controlo negativo.

Preparação do inóculo

Os inóculos das culturas de leveduras foram preparados suspendendo cinco colónias (<1 mm de diâmetro), a partir de uma cultura incubada nas 24h anteriores em meio PDA a 35°C, em pelo menos 3 mL de água destilada estéril de forma a obter uma suspensão inicial com uma turbidez 0,5 na escala de McFarland ($\approx 5 \times 10^6$ UFC/mL). Esta suspensão inicial foi diluída 1:10 em água destilada estéril de forma a obter o inóculo final de trabalho.

Inoculação das microplacas

As microplacas foram inoculadas no máximo até 30 minutos após a preparação do inóculo final. Depois de bem agitado, foram adicionados 100 μ L de inóculo a cada poço das colunas 1-11 da microplaca (coluna 11 - controlo positivo) (a concentração celular de cada poço será assim na gama $0,5-2,5 \times 10^5$ UFC/mL). Aos poços da coluna 12 das microplacas foram adicionados 100 μ L de água destilada estéril (controlo de esterilidade).

As placas foram incubadas a 35°C durante 24h, sem agitação.

Leitura das microplacas

A leitura das absorvâncias das placas de microdiluição foi feita com recurso ao leitor de microplacas The Synergy™ HT Multi-Detection Microplate Reader (BioTek Instruments, Winooski, VT) no comprimento de onda de 530 nm. O valor do branco (coluna 12) foi deduzido aos valores das absorvâncias e, posteriormente, foi determinada a CMI.

A CMI foi definida como a concentração mais baixa que inibe o crescimento em 50% (CMI₅₀) em comparação com o crescimento do controlo positivo. Foi também definida a CMI₈₀ em que há uma diminuição de 80% do crescimento comparativamente ao crescimento controlo.

Determinação do efeito sinérgico entre agentes antifúngicos e compostos naturais

Para testar a actividade sinérgica das combinações entre os agentes antifúngicos e os compostos naturais em estudo foi calculado o índice de Concentração Inibitória Fraccional (CIF) da seguinte forma:

$$\text{CIF} = \text{CIF}_A + \text{CIF}_B, \text{ onde}$$

$\text{CIF}_A = (\text{CMI do composto A em combinação} / \text{CMI do composto A individualmente})$

$\text{CIF}_B = (\text{CMI do composto B em combinação} / \text{CMI do composto B individualmente})$

A combinação foi considerada sinérgica quando $\text{CIF} \leq 0,5$, e antagonista quando $\text{CIF} > 2$. Resultados que mostrem valores de CIF entre 0,5 e 2, o efeito da combinação é considerado indiferente (Mahboudi e Ghazian Bidgoli, 2010).

2.4.3. Inibição *in vitro* de biofilmes

Nesta fase do trabalho foi usado um modelo em microplacas de 96 poços para a formação de biofilmes fúngicos, originalmente desenvolvido para *C. albicans* e outras espécies de *Candida*. (Pierce *et al.*, 2008). Após a formação dos biofilmes foi aferida a sua actividade metabólica através de um teste colorimétrico semiquantitativo baseado na redução do sal de tetrazólio (XTT).

O carvacrol foi o único composto natural testado nesta fase, assim como o agente antifúngico fluconazol. Nestes testes foi utilizada a estirpe de *C. albicans* SER7, com resistência ao fluconazol.

Preparação do inóculo

Foram inoculados frascos com 20 mL de meio SDB com células de *C. albicans* SER7 provenientes de uma cultura em meio PDA incubadas a 35°C por 24h. Os frascos foram incubados durante cerca de 16h a 30°C com agitação (150-180 rpm). Após incubação, as células foram colhidas por centrifugação (3000g, 5 min, 4°C) e lavadas duas vezes com PBS estéril. O sedimento final foi suspenso em 20 mL de RPMI-1640 2%G pré-aquecido a 37°C. Da suspensão celular resultante foram feitas diluições em RPMI-1640 2%G de maneira a obter uma suspensão celular com uma turbidez 1,0 na escala de McFarland ($\approx 1,0 \times 10^6$ UFC/mL).

Formação do biofilme

Foram transferidos 100 µL do inóculo preparado anteriormente para os poços 1-11 de cada linha das microplacas (poço 12 - controlo de esterilidade).

As microplacas foram seladas com a tampa própria de cada uma e com parafilme, e incubadas a 37°C durante 24h.

Depois da formação do biofilme, o meio de cultura foi cuidadosamente removido com o auxílio de uma micropipeta, de modo a não perturbar o biofilme. Os poços das microplacas foram lavados duas vezes com PBS estéril (200-300 µL/poço) de maneira a remover as células planctónicas e/ou não aderentes presentes no poço.

Soluções de trabalho de fluconazol, carvacrol e das combinações destes compostos

A partir das soluções *stock* foi preparada uma solução de trabalho de fluconazol com uma concentração final de 1024 mg/L em RPMI-1640 2%G; e uma solução de trabalho de carvacrol com uma concentração final de 4096 mg/L. Destas soluções de trabalho foram preparadas várias misturas em diferentes proporções, descritas na Tabela 4.

Tabela 4. Misturas das soluções de trabalho de fluconazol e carvacrol em diferentes proporções, usadas para testar a sinergia potencial dos compostos antimicrobianos no modelo de biofilme.

Mistura	Volume de solução de trabalho de fluconazol (µL)	Volume de solução de trabalho de carvacrol (µL)	[Fluconazol] (mg/L)	[Carvacrol] (mg/L)
M1	510	90	870	614
M2	420	180	717	1229
M3	300	300	512	2048
M4	180	420	307	2867
M5	90	510	154	3482

Actividade antifúngica nos biofilmes

Foram adicionados 200 µL das soluções de trabalho de fluconazol, carvacrol e das misturas aos poços correspondentes na coluna 1 das microplacas, que continham o biofilme, cuidadosamente para não tocar nem perturbar o biofilme. Nas colunas 2 a 11 foram adicionados 100 µL de RPMI-1640 2%G. O poço 11 é o controlo positivo - biofilme não exposto ao agente antifúngico ou composto natural; o poço 12 permanece vazio como controlo negativo.

De seguida, foram executadas várias diluições em série removendo 100 µL das soluções antifúngicas da coluna 1 para a coluna 2 (que já continha 100 µL de RPMI-1640 2%G), depois da coluna 2 para a coluna 3, e assim sucessivamente até à coluna 10

(Figura 17). Os 100 μ L restantes da coluna 10 foram descartados depois de feita a diluição. Cada composto foi testado em triplicado e cada mistura em duplicado.

Após as diluições, as microplacas foram fechadas com a sua tampa própria, seladas com parafilme e incubadas a 37°C durante 24h.

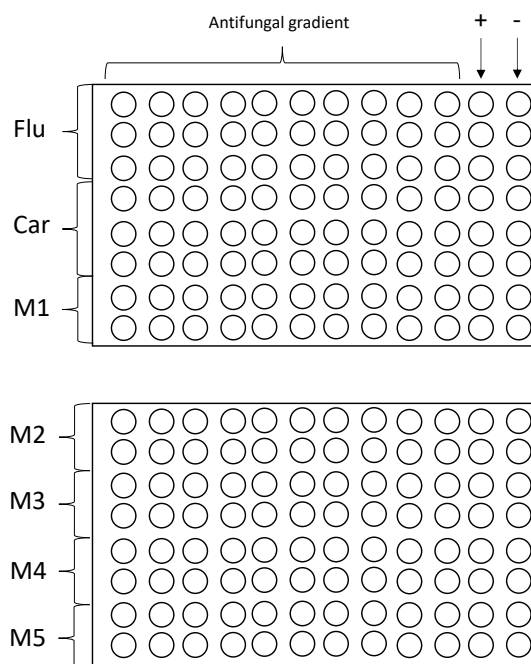


Figura 17. Esquema final obtido após as diluições seriadas dos compostos e misturas em estudo (coluna 1-10), e controles positivo (coluna 11) e negativo (coluna 12). Flu - fluconazol; Car - carvacrol; M1 - mistura 1; M2 - mistura 2; M3 - mistura 3; M4 - mistura 4; M5 - mistura 5

Actividade metabólica dos biofilmes

Foi adicionado 1 μ L da solução *stock* de menadiona a 10 mM a um tubo com 10 mL de solução *stock* de XTT a 0,5 g/L (de modo a obter uma concentração final de menadiona de 1 μ M). Desta solução XTT/menadiona foram adicionados 100 μ L a cada poço contendo o biofilme, assim como, ao poço da coluna 12. O poço da coluna 12 é o controlo negativo e é usado como branco para medição dos níveis colorimétricos de fundo do XTT.

As microplacas foram cobertas com folhas de alumínio e incubadas durante 2-3h a 37°C no escuro. Assim que o XTT for metabolizado efectivamente pelas células fúngicas, a solução originalmente transparente passa a cor de laranja.

Após a incubação, com o auxílio de uma micropipeta, foram transferidos 75-80 µL do sobrenadante colorido resultante de cada poço para uma nova microplaca. Foi feita a leitura da nova microplaca no leitor de microplacas The Synergy™ HT Multi-Detection Microplate Reader (BioTek Instruments, Winooski, VT) a 490 nm. Destas leituras foi subtraído o valor do controlo negativo e calculada a concentração mínima inibitória séssil (CMIS): a CMIS₅₀ e a CMIS₈₀ são as concentrações antifúngicas nas quais é detectado um decréscimo de 50% ou 80% nas absorvâncias em comparação com o controlo do biofilme formado pelo mesmo isolado fúngico na ausência de agentes antifúngicos (poço 11). A avaliação do efeito sinérgico potencial entre o fluconazol e o carvacrol foi realizada através da determinação do CIF, como foi descrito atrás.

RESULTADOS

3. RESULTADOS

3.1. Susceptibilidade de *Candida albicans* ATCC 90028 aos compostos naturais e agentes antifúngicos

Numa primeira fase do trabalho foi determinada a CMI de uma estirpe de *C. albicans* (ATCC 90028). Destes compostos apenas o carvacrol, o eugenol e o timol mostraram algum efeito antifúngico contra a estirpe em estudo (Tabela 5). Foram também determinadas as CMI dos agentes antifúngicos fluconazol e voriconazol para a mesma estirpe.

Foi feita a classificação da sensibilidade desta estirpe através de tabelas EUCAST, e a estirpe revelou ser susceptível ao fluconazol e resistente ao voriconazol.

O DMSO, usado como controlo de inibição, não mostrou sinais de inibição de crescimento das culturas.

Tabela 5. Concentração mínima inibitória de compostos naturais e agentes antifúngicos contra *Candida albicans* ATCC 90028.

Composto	Gama de concentrações testada (mg/L)	<i>Candida albicans</i> ATCC 90028	
		CMI ₅₀ (mg/L)	CMI ₈₀ (mg/L)
Carvacrol	0,5-256	128	256
α -pineno	0,5-256	na	na
Citronellal	0,5-256	na	na
Linalool	0,5-256	na	na
Eugenol	0,5-256	256	256
Nerolidol	0,5-256	na	na
Timol	0,5-256	128	128
Fluconazol	0,125-64	0,25	32
Voriconazol	0,008-4	0,25	0,5

na - CMI não atingida à máxima concentração testada

3.2. Susceptibilidade de *Candida* spp. ao carvacrol, eugenol, timol, fluconazol e voriconazol

Foi feita a classificação da sensibilidade das estirpes em estudo nesta fase em relação aos agentes antifúngicos fluconazol e voriconazol.

As três estirpes de *Candida parapsilosis* em estudo demonstraram ser susceptíveis ao fluconazol e ao voriconazol (Tabela 6). Os compostos naturais testados mostraram também alguma actividade antimicrobiana contra estas estirpes (Tabela 6).

Tabela 6. Concentração mínima inibitória de compostos naturais e agentes antifúngicos relativamente a três estirpes de *Candida parapsilosis*.

		<i>C. parapsilosis</i> CAN260		<i>C. parapsilosis</i> 59/13		<i>C. parapsilosis</i> 246/11	
Composto	Gama de concentrações testada (mg/L)	CMI ₅₀ (mg/L)	CMI ₈₀ (mg/L)	CMI ₅₀ (mg/L)	CMI ₈₀ (mg/L)	CMI ₅₀ (mg/L)	CMI ₈₀ (mg/L)
Carvacrol	0,5-256	32	64	64	128	128	256
Eugenol	0,5-256	32	64	128	256	256	256
Timol	0,5-256	128	128	64	128	64	64
Fluconazol	0,125-64	0,5	1	0,25	0,5	1	32
Voriconazol	0,008-4	0,016	0,016	0,016	2	0,031	na

na - CMI não atingida à máxima concentração testada

As estirpes de *Candida* de espécies intrinsecamente resistentes ao fluconazol (*C. krusei* 5/11 e *C. krusei* 282/09) e susceptíveis dependendo da dose (*C. glabrata* 50/14 e *C. glabrata* 531/14) mostraram também alguma sensibilidade aos compostos naturais, principalmente, ao carvacrol (Tabelas 7 e 8). *Candida albicans* SER7 mostrou resistência ao fluconazol e ao voriconazol mas os compostos naturais parecem ter também algum efeito antimicrobiano contra esta estirpe, com a excepção do eugenol (Tabela 7). No caso de *C. guilliermondii* susceptível ao fluconazol, os compostos naturais também exibiram actividade antifúngica sobre esta, principalmente o timol.

Dos três compostos naturais testados nesta fase, o carvacrol pareceu ser aquele com melhor actividade antifúngica em geral contra estas estirpes.

Tabela 7. Concentração mínima inibitória de compostos naturais e agentes antifúngicos relativamente às duas estirpes de *Candida krusei* estudadas e à estirpe de *Candida albicans* SER7

		<i>C. krusei</i> 5/11		<i>C. krusei</i> 282/09		<i>C. albicans</i> SER7	
Composto	Gama de concentrações testada (mg/L)	CMI ₅₀ (mg/L)	CMI ₈₀ (mg/L)	CMI ₅₀ (mg/L)	CMI ₈₀ (mg/L)	CMI ₅₀ (mg/L)	CMI ₈₀ (mg/L)
Carvacrol	0,5-256	64	128	64	128	128	128
Eugenol	0,5-256	128	256	256	na	na	na
Timol	0,5-256	128	256	128	128	256	256
Fluconazol	0,125-64	64	64	16	32	16	32
Voriconazol	0,008-4	0,25	0,5	0,25	0,25	0,25	0,5

na - CMI não atingida à máxima concentração testada

Tabela 8. Concentração mínima inibitória de compostos naturais e agentes antifúngicos relativamente às duas estirpes de *Candida glabrata* e *Candida guilliermondii*

		<i>C. glabrata</i> 50/14		<i>C. glabrata</i> 531/14		<i>C. guilliermondii</i> 112/13	
Composto	Gama de concentrações testada (mg/L)	CMI ₅₀ (mg/L)	CMI ₈₀ (mg/L)	CMI ₅₀ (mg/L)	CMI ₈₀ (mg/L)	CMI ₅₀ (mg/L)	CMI ₈₀ (mg/L)
Carvacrol	0,5-256	128	128	64	128	128	256
Eugenol	0,5-256	256	na	256	na	256	256
Timol	0,5-256	256	256	256	na	32	256
Fluconazol	0,125-64	4	8	32	32	2	4
Voriconazol	0,008-4	0,125	0,25	0,5	2	0,5	2

na - CMI não atingida à máxima concentração testada

3.3. Sinergia na actividade antifúngica entre os compostos naturais, fluconazol e voriconazol

Nesta fase o objectivo foi avaliar se a actividade antimicrobiana dos agentes antifúngicos melhorava por sinergia quando misturados com os compostos naturais. Para isso foram testadas quatro estirpes de *Candida*, que foram submetidas a várias combinações de concentrações de agente antifúngico e composto natural. A avaliação do tipo de efeito de cada combinação foi feita com recurso à determinação do índice CIF. São considerados de interesse todos os valores em que houve inibição de crescimento abaixo da CMI previamente determinada na fase anterior, quando os compostos foram testados individualmente.

No caso de *C. parapsilosis* 246/11, em geral, os resultados mostraram sinais de antagonismo quando os agentes antifúngicos estavam combinados com os compostos naturais, mas com algumas excepções. É possível observar um efeito sinérgico quando o fluconazol estava em combinação com o carvacrol às concentrações de 0,25 mg/L (fluconazol) + 32 mg/L (carvacrol) e a 0,125 mg/L (fluconazol) + 32 mg/L (carvacrol) (Tabela 9). Este antifúngico em combinação com o eugenol apresenta um efeito sinérgico quando o fluconazol está a 0,25 mg/L e a 0,125 mg/L, desde que a concentração de eugenol não ultrapasse os 64 mg/L (Tabela 10). No caso da combinação de fluconazol com timol, não é possível observar nenhum efeito sinérgico por parte dos compostos. Relativamente ao voriconazol, não foi obtido nenhum resultado de efeito sinérgico quando em combinação com os compostos naturais em estudo, à excepção do eugenol (Tabelas 11 e 12).

Tabela 9. Índice de concentração inibitória fraccional para misturas com concentrações diferentes de fluconazol e carvacrol relativamente a *Candida parapsilosis* 246/11

		[Fluconazol] mg/L		
		0,5	0,25	0,125
[Carvacrol] mg/L	64	1,00	0,75	0,63
	32	0,75	0,50	0,38
	16			
	8			
	4		0,28	
	2			

Nota: as células a cinzento representam as misturas em que não ocorreu pelo menos 50% de inibição do crescimento da estirpe

Tabela 10. Índice de concentração inibitória fraccional para misturas com concentrações diferentes de fluconazol e eugenol relativamente a *Candida parapsilosis* 246/11

		[Fluconazol] mg/L		
		0,5	0,25	0,125
[Eugenol] mg/L	128	1,00	0,75	0,63
	64	0,75	0,50	0,38
	32	0,63	0,38	0,25
	16	0,56	0,31	0,19
	8		0,28	0,16
	4		0,27	0,14
	2		0,26	0,13

Nota: as células a cinzento representam as misturas em que não ocorreu pelo menos 50% de inibição do crescimento da estirpe

Tabela 11. Índice de concentração inibitória fraccional para misturas com concentrações diferentes de voriconazol e carvacrol relativamente a *Candida parapsilosis* 246/11

		[Voriconazol] mg/L	
		0,016	0,008
[Carvacrol] mg/L	64	1,02	0,76
	32	0,77	
	16	0,64	
	8	0,58	
	4	0,55	
	2	0,53	

Nota: as células a cinzento representam as misturas em que não ocorreu pelo menos 50% de inibição do crescimento da estirpe

Tabela 12. Índice de concentração inibitória fraccional para misturas com concentrações diferentes de voriconazol e eugenol relativamente a *Candida parapsilosis* 246/11

		[Voriconazol] mg/L	
		0,016	0,008
[Eugenol] mg/L	128	1,02	0,76
	64		
	32	0,64	
	16	0,58	0,32
	8	0,55	0,29
	4	0,53	0,27
	2	0,52	0,27

Nota: as células a cinzento representam as misturas em que não ocorreu pelo menos 50% de inibição do crescimento da estirpe

A acção da combinação de compostos relativamente a *C. krusei* 5/11 apresentou resultados bastante promissores apresentando um grande efeito sinérgico quando os agentes antifúngicos estavam em combinação com os compostos naturais carvacrol e eugenol (Tabelas 13, 14, 16 e 17). Contrariamente a combinação do fluconazol com o timol mostra um efeito indiferente (Tabela 15) e quando combinado com voriconazol

um efeito antagonista, sendo que nos valores de interesse para o cálculo do CIF não ocorreu uma inibição de pelo menos 50% do crescimento.

Tabela 13. Índice de concentração inibitória fraccional para misturas com concentrações diferentes de fluconazol e carvacrol relativamente a *Candida krusei* 5/11

		[Fluconazol] mg/L								
		32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125
[Carvacrol] mg/L	32	1,00	0,75	0,63	0,56	0,53	0,52	0,51	0,50	0,50
	16	0,75	0,50	0,38	0,31	0,28	0,27	0,26	0,25	
	8	0,63	0,38	0,25	0,19	0,16	0,14	0,13		
	4	0,56	0,31	0,19	0,13	0,09	0,08			
	2	0,53	0,28	0,16	0,09		0,05	0,04		

Nota: as células a cinzento representam as misturas em que não ocorreu pelo menos 50% de inibição do crescimento da estirpe

Tabela 14. Índice de concentração inibitória fraccional para misturas com concentrações diferentes de fluconazol e eugenol relativamente a *Candida krusei* 5/11

		[Fluconazol] mg/L								
		32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125
[Eugenol] mg/L	64	1,00	0,75	0,63	0,56	0,53	0,52	0,51	0,50	0,50
	32	0,75	0,50	0,38	0,31	0,28	0,27		0,25	0,25
	16	0,63	0,38	0,25	0,19	0,16	0,14	0,13	0,13	
	8	0,56	0,31			0,09		0,07	0,07	
	4	0,53	0,28	0,16	0,09			0,04		
	2	0,52	0,27	0,14	0,08					

Nota: as células a cinzento representam as misturas em que não ocorreu pelo menos 50% de inibição do crescimento da estirpe

Tabela 15. Índice de concentração inibitória fraccional para misturas com concentrações diferentes de fluconazol e timol relativamente a *Candida krusei* 5/11

		[Fluconazol] mg/L								
		32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125
[Timol] mg/L	64	1,00								
	32									
	16	0,63								
	8	0,56								
	4	0,53								
	2	0,52								

Nota: as células a cinzento representam as misturas em que não ocorreu pelo menos 50% de inibição do crescimento da estirpe

Tabela 16. Índice de concentração inibitória fraccional para misturas com concentrações diferentes de voriconazol e carvacrol relativamente a *Candida krusei* 5/11

		[Voriconazol] mg/L				
		0,125	0,062	0,031	0,016	0,008
[Carvacrol] mg/L	32	1	0,75	0,62	0,56	0,53
	16	0,75	0,5	0,37	0,31	0,28
	8	0,63	0,37	0,25	0,19	0,16
	4	0,56	0,31	0,19	0,13	0,09
	2	0,53	0,28	0,16		0,06

Nota: as células a cinzento representam as misturas em que não ocorreu pelo menos 50% de inibição do crescimento da estirpe

Tabela 17. Índice de concentração inibitória fraccional para misturas com concentrações diferentes de voriconazol e eugenol relativamente a *Candida krusei* 5/11

		[Voriconazol] mg/L				
		0,125	0,062	0,031	0,016	0,008
[Eugenol] mg/L	64	1	0,75	0,62	0,56	0,53
	32	0,75	0,50	0,37		
	16	0,63	0,37	0,25	0,19	
	8		0,31	0,19		0,09
	4	0,53	0,28		0,10	0,06
	2	0,52	0,26		0,08	0,05

Nota: as células a cinzento representam as misturas em que não ocorreu pelo menos 50% de inibição do crescimento da estirpe

Com *C. glabrata* 531/14 foram obtidos resultados semelhantes à estirpe anterior. Foi observado um efeito sinérgico quando os agentes antifúngicos estavam em combinação com os compostos naturais carvacrol e eugenol (Tabelas 18, 19, 21 e 22). No caso do timol em combinação com o fluconazol é possível observar um efeito sinérgico quando os compostos estão às seguintes concentrações: 8 mg/L (fluconazol) + 64 mg/L (carvacrol), 2 mg/L (fluconazol) + 64 mg/L (carvacrol), 1 mg/L (fluconazol) + 64 mg/L carvacrol, e 0,125 mg/L (fluconazol) + 128 mg/L (carvacrol) (Tabela 20). A combinação deste composto com o voriconazol mostrou sinais de efeito indiferente (Tabela 23) e, para concentrações superiores de voriconazol, um efeito antagonista.

Tabela 18. Índice de concentração inibitória fraccional para misturas com concentrações diferentes de fluconazol e carvacrol relativamente a *Candida glabrata* 531/14

		[Fluconazol] mg/L							
		16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125
[Carvacrol] mg/L	32	1,00	0,75	0,63	0,56	0,53	0,52	0,51	
	16	0,75	0,50	0,38	0,31	0,28	0,27	0,26	
	8	0,63	0,38	0,25	0,19	0,16	0,14	0,13	
	4	0,56	0,31	0,19	0,13	0,09	0,08	0,07	0,07
	2	0,53	0,28	0,16	0,09	0,06	0,05	0,04	0,04

Nota: as células a cinzento representam as misturas em que não ocorreu pelo menos 50% de inibição do crescimento da estirpe

Tabela 19. Índice de concentração inibitória fraccional para misturas com concentrações diferentes de fluconazol e eugenol relativamente a *Candida glabrata* 531/14

		[Fluconazol] mg/L							
		16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125
[Eugenol] mg/L	128	1,00	0,75	0,63	0,56	0,53	0,52	0,51	0,50
	64	0,75	0,50	0,38	0,31	0,28	0,27	0,26	0,25
	32	0,63	0,38	0,25	0,19	0,16	0,14	0,13	0,13
	16	0,56	0,31	0,19	0,13		0,08		0,07
	8	0,53	0,28	0,16	0,09		0,05		
	4	0,52	0,27	0,14	0,08	0,05	0,03	0,02	
	2	0,51	0,26	0,13	0,07		0,02	0,02	

Nota: as células a cinzento representam as misturas em que não ocorreu pelo menos 50% de inibição do crescimento da estirpe

Tabela 20. Índice de concentração inibitória fraccional para misturas com concentrações diferentes de fluconazol e timol relativamente a *Candida glabrata* 531/14

		[Fluconazol] mg/L							
		16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125
[Timol] mg/L	128	1,00	0,75	0,63	0,56	0,53	0,52	0,51	0,50
	64	0,75	0,50		0,31	0,28			
	32								
	16								
	8								
	4								
	2								

Nota: as células a cinzento representam as misturas em que não ocorreu pelo menos 50% de inibição do crescimento da estirpe

Tabela 21. Índice de concentração inibitória fraccional para misturas com concentrações diferentes de voriconazol e carvacrol relativamente a *Candida glabrata* 531/14

		[Voriconazol] mg/L					
		0,25	0,125	0,062	0,031	0,016	0,008
[Carvacrol] mg/L	32	1,00	0,75	0,62	0,56	0,53	0,52
	16	0,75	0,50	0,37	0,31	0,28	
	8	0,63	0,38	0,25	0,19	0,16	0,14
	4	0,56	0,31	0,19	0,12	0,09	0,08
	2	0,53	0,28	0,16	0,09	0,06	0,05

Nota: as células a cinzento representam as misturas em que não ocorreu pelo menos 50% de inibição do crescimento da estirpe

Tabela 22. Índice de concentração inibitória fraccional para misturas com concentrações diferentes de voriconazol e eugenol relativamente a *Candida glabrata* 531/14

		[Voriconazol] mg/L					
		0,25	0,125	0,062	0,031	0,016	0,008
[Eugenol] mg/L	128	1,00	0,75	0,62	0,56	0,53	0,52
	64	0,75	0,50	0,37	0,31	0,28	0,27
	32	0,63	0,38	0,25	0,19	0,16	
	16	0,56	0,31	0,19	0,12	0,09	0,08
	8	0,53	0,28	0,16	0,09	0,06	0,05
	4	0,52	0,27	0,14	0,08	0,05	0,03
	2	0,51	0,26	0,13	0,07	0,04	

Nota: as células a cinzento representam as misturas em que não ocorreu pelo menos 50% de inibição do crescimento da estirpe

Tabela 23. Índice de concentração inibitória fraccional para misturas com concentrações diferentes de voriconazol e timol relativamente a *Candida glabrata* 531/14

		[Voriconazol] mg/L					
		0,25	0,125	0,062	0,031	0,016	0,008
[Timol] mg/L	128	1,00	0,75	0,62	0,56	0,53	0,52
	64						
	32						
	16						
	8						
	4						
	2						

Nota: as células a cinzento representam as misturas em que não ocorreu pelo menos 50% de inibição do crescimento da estirpe

Relativamente à estirpe *C. albicans* SER7, não foi possível a determinação do CIF para o eugenol. Não foi obtido o valor da CMI de eugenol à máxima concentração testada, sendo este valor necessário para o cálculo do CIF. Assim, não foi possível fazer uma comparação dos resultados deste composto em combinação com os agentes antifúngicos. No caso do carvacrol, tanto em combinação com o fluconazol como com o voriconazol, não mostrou sinais de efeito sinérgico. O mesmo aconteceu com o timol, à excepção de quando em combinação com fluconazol a uma concentração de 2 mg/L (fluconazol) + 64 mg/L (timol), com um CIF = 0,38 o que indica um efeito sinérgico (Tabela 28). A combinação de timol com voriconazol não mostrou sinais de efeito sinérgico (Tabela 30).

Tabela 24. Índice de concentração inibitória fraccional para misturas com concentrações diferentes de fluconazol e timol relativamente a *Candida albicans* SER7

		[Fluconazol] mg/L						
		8	4	2	1	0,5	0,25	0,125
[Timol] mg/L	128	1,00	0,75	0,63	0,56	0,53	0,52	0,51
	64			0,38				
	32							
	16							
	8							
	4							
	2							

Nota: as células a cinzento representam as misturas em que não ocorreu pelo menos 50% de inibição do crescimento da estirpe

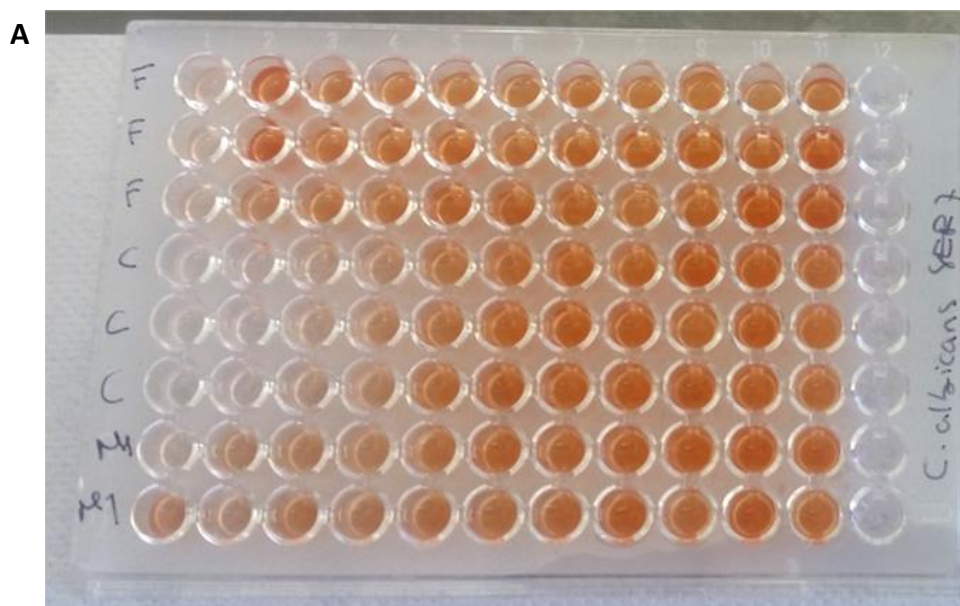
Tabela 25. Índice de concentração inibitória fraccional para misturas com concentrações diferentes de voriconazol e timol relativamente a *Candida albicans* SER7

		[Voriconazol] mg/L				
		0,125	0,062	0,031	0,016	0,008
[Timol] mg/L	128	1,00	0,75	0,62	0,56	0,53
	64					
	32					
	16					
	8					
	4					
	2					

Nota: as células a cinzento representam as misturas em que não ocorreu pelo menos 50% de inibição do crescimento da estirpe

3.4. Inibição *in vitro* de biofilmes de *Candida albicans* SER7

Nesta fase do estudo foi testado o efeito do carvacrol e do fluconazol isoladamente e em combinações de diferentes proporções em biofilmes pré-formados de *C. albicans* SER7 com resistência ao fluconazol. Depois de determinadas as CMIS foi possível observar que o carvacrol apresentou uma CMIS₅₀ muito inferior à do fluconazol (Tabela 26), ou seja, o carvacrol teve um maior efeito de inibição nos biofilmes da estirpe em estudo do que o antifúngico convencional. Isto quando se registou uma inibição de 50% do crescimento. O mesmo não aconteceu para inibição de 80% do crescimento. Neste caso, a CMIS₈₀ do fluconazol foi inferior à do carvacrol.



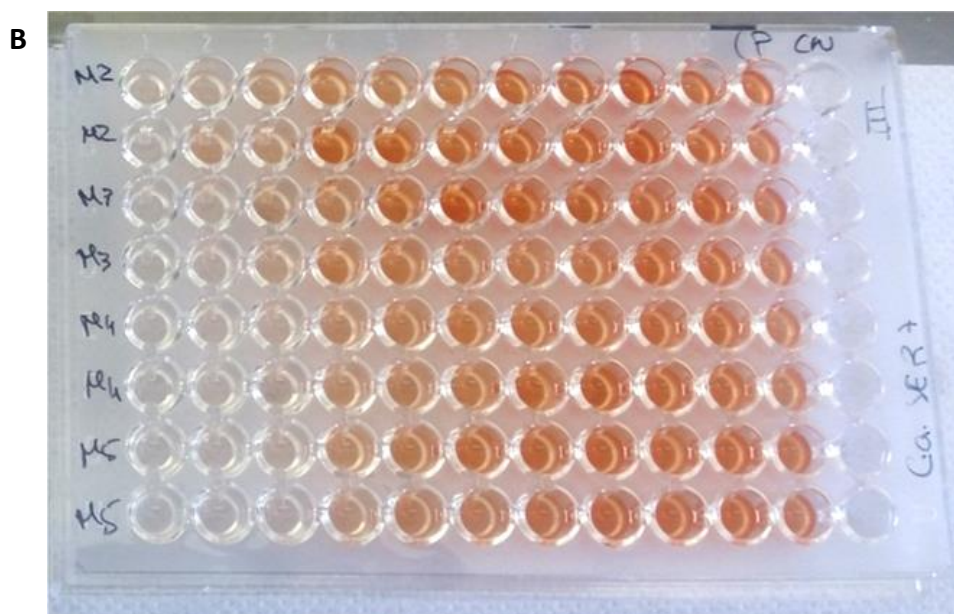


Figura 19. Ilustração dos resultados do teste de redução do XTT de modo a avaliar os efeitos de fluconazol e carvacrol, (A, na página anterior) isoladamente e (B) em combinações de diferentes proporções, em biofilmes de *Candida albicans* SER 7. Na microplaca A estão ilustrados os resultados da actividade antifúngica de fluconazol (F), carvacrol (C) e da mistura 1 (M1) Na microplaca B estão ilustrados os resultados da actividade antifúngica das misturas: 2 (M2), 3 (M3), 4 (M4) e 5 (M5).

Tabela 26. Concentração mínima inibitória séssil do carvacrol e fluconazol contra *Candida albicans* SER7

Composto	CMIS ₅₀ (mg/L)	CMIS ₈₀ (mg/L)
Carvacrol	512	4096
Fluconazol	1024	1024

A mistura que contém uma maior concentração de carvacrol (M5) têm uma CMIS₅₀ inferior à mistura com maior concentração de fluconazol (M1) (Tabela 27), o que sugere que o agente responsável pela maior inibição dos biofilmes será o carvacrol. Curiosamente, o mesmo acontece para os valores de CMIS₈₀. Isoladamente, o carvacrol apresentar uma CMIS₈₀ superior à do fluconazol, então seria de esperar que M1 (com maior concentração de fluconazol) tivesse melhores resultados de inibição que as outras misturas, mas isto não aconteceu. Combinações com maiores concentrações de carvacrol (M2-M5) que M1 mostraram maior efeito inibitório, sugerindo que o carvacrol tem algum tipo de contribuição para estes resultados quando combinado com o fluconazol.

Com a combinação dos dois compostos foi possível obter um efeito inibitório de fluconazol com concentrações 10-200 vezes mais baixas comparativamente à CMIS₅₀ de fluconazol individualmente e 5-27 vezes mais baixa que a CMIS₈₀ de fluconazol individualmente.

Foi calculado o índice CIF para determinar se as interações entre o fluconazol e o carvacrol (M1-M5) tinham um efeito inibitório do crescimento tipo sinérgico, indiferente ou antagonista. Tendo em conta que os resultados indicam valores de CIF inferiores a 0,5 para todas as combinações, tanto quando há inibição de 50% do crescimento como de 80%, isto indica que as combinações têm um efeito antifúngico em biofilmes sinérgico (Tabela 27).

Tabela 27. Concentração mínima inibitória séssil das combinações de carvacrol e fluconazol contra *Candida albicans* SER7 e respectivos índices CIF

Combinações ¹	CMIS ₅₀ (mg/L)			CMIS ₈₀ (mg/L)		
	[fluconazol (mg/L)] : [carvacrol (mg/L)]	Diluição	CIF	[fluconazol (mg/L)] : [carvacrol (mg/L)]	Diluição	CIF
M1	109: 77	1:8	0,26	>870 : 614	>1:1	
M2	45 : 77	1:16	0,19	179 : 307	1:4	0,25
M3	32 : 128	1:16	0,28	128 : 512	1:4	0,25
M4	19 : 179	1:16	0,37	77 : 717	1:4	0,25
M5	5 : 109	1:32	0,22	38 : 870	1:4	0,25

¹M1 - mistura 1; M2 - mistura 2; M3 - mistura 3; M4 - mistura 4; M5 - mistura 5

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

4. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

4.1. Susceptibilidade de *Candida albicans* ATCC 90028 aos compostos naturais e agentes antifúngicos

Reginato *et al.* (2017) testaram alguns compostos naturais em 20 estirpes de *C. albicans* susceptíveis ao fluconazol isoladas de casos de candidíase orofaríngea, entre eles o carvacrol, o eugenol e o timol. Os resultados das CMI's obtidos por estes autores foram semelhantes aos obtidos neste trabalho para os mesmos três compostos.

Relativamente apenas ao carvacrol, este apresentou uma CMI₅₀ e CMI₈₀ de 128 mg/L e 256 mg/L, respectivamente, sendo dos compostos naturais que mostrou melhor actividade antifúngica. Raut *et al.* (2013) e Doke *et al.* (2014) reportaram uma CMI₅₀ mais elevada (250 mg/L), enquanto que Cosentino *et al.* (1999), Tampieri *et al.* (2005) e Halbandge *et al.* (2017) apresentaram também resultados semelhantes aos obtidos neste trabalho.

No caso do α -pineno não foi alcançado o valor da CMI para a concentração máxima testada neste trabalho (256 mg/L). Cosentino *et al.* (1999) e Tampieri *et al.* (2005) também não conseguiram determinar a CMI à máxima concentração por eles testada, de mais de 900 mg/L e 1000 mg/L, respectivamente. Noutro estudo, Halbandge *et al.* (2017) avaliaram a actividade de vários compostos em diferentes modos de crescimento de *C. albicans* ATCC 90028. A CMI de α -pineno não foi alcançada à máxima concentração testada de 4000 mg/L. Contrariamente, Silva *et al.* (2012) reportaram uma CMI de 3125 mg/L e Raut *et al.* (2013) de 2000 mg/L, em *C. albicans*.

À semelhança do composto anterior, não foi possível alcançar a CMI à máxima concentração testada, não se obtendo qualquer actividade antifúngica por parte do citronelal. Na literatura estão reportadas CMI's de 1000 mg/L (Raut *et al.*, 2013; De Toledo *et al.*, 2016; Halbandge *et al.*, 2017).

A actividade do linalool é controversa pois alguns autores consideram este composto inactivo enquanto outros consideram ter uma actividade antifúngica moderada (Palmeira-de-Oliveira *et al.*, 2009). Num estudo levado a cabo por Cosentino *et al.* (1999), não foi observada actividade antifúngica por parte do linalool com CMI's superiores a 900 mg/L em todos os microrganismos em estudo, entre eles *C. albicans*.

Halbandge *et al.* (2017) reportaram que o linalool apresentou uma CMI de 1000 mg/L e Raut *et al.* (2013) de 2000 mg/L. Outros estudos contrariam os resultados anteriores (Alviano *et al.*, 2005; Tampieri *et al.*, 2005; Mandras *et al.*, 2016). No nosso estudo não foi também observada actividade antifúngica por parte deste composto.

A CMI do eugenol foi de 256 mg/L (CMI₅₀ e CMI₈₀), o que está de acordo com Raut *et al.* (2013), Ahmad *et al.* (2015), e Ahmad *et al.* (2010), estes últimos testaram o eugenol tanto em estirpes sensíveis como resistentes e obtiveram valores de CMI semelhantes aos obtidos neste trabalho. No entanto, Doke *et al.* (2014) reportaram uma CMI duas vezes mais elevada para este composto.

Os efeitos do nerolidol estão reportados na literatura (Chan *et al.*, 2016), no entanto, estudos relativamente ao efeito antifúngico deste composto são escassos, especialmente em espécies de *Candida*. Curvelo *et al.* (2014) reportaram a eficácia do nerolidol como antifúngico, incluindo para a inibição de biofilmes formados por *C. albicans*. Por outro lado, Jamali *et al.* (2012) reportaram que o óleo essencial de *Thymus serpyllum* (rico em acetato de linalilo e nerolidol) foi o que mostrou a actividade mais fraca contra várias espécies de *Candida* (*C. albicans*, *C. krusei*, *C. glabrata* e *C. parapsilosis*), apresentando valores elevados de CMI (3520-7050 mg/L). Neste estudo também não foi observada actividade antifúngica por parte do nerolidol à máxima concentração testada.

Tal como para o carvacrol e o eugenol, também foi possível observar um efeito inibitório do crescimento por parte do timol com uma CMI de 128 mg/L. Este resultado está de acordo com a maior parte dos estudos descritos na literatura (Braga *et al.*, 2007; Guo *et al.*, 2009; Ahmad *et al.*, 2011; Shu *et al.*, 2016). Doke *et al.* (2014) descreveu uma CMI superior de 500 mg/L e, contrariamente, de Castro *et al.* (2015) descreveu uma CMI bastante inferior à reportada neste trabalho, de 39 mg/L.

Embora os compostos naturais como os monoterpenos actuem na ruptura da membrana plasmática microbiana, os mecanismos envolvidos nesta acção ainda estão pouco caracterizados (Ahmad *et al.*, 2010).

O timol, o eugenol e o carvacrol conseguem interferir com a permeabilidade e fluidez da membrana de *C. albicans* resultando na desintegração da parede celular. Isto é uma característica útil porque significa interferir com o importante factor de virulência de adesão às superfícies sólidas e a transição morfológica para a forma de hifa,

reduzindo assim a capacidade do fungo para colonizar os tecidos do hospedeiro e aumentar a sua infecciosidade (Braga *et al.*, 2007; Marcos-Arias *et al.*, 2011).

Rao *et al.* (2010) mostraram que a actividade antifúngica depende da presença de um grupo hidroxil no anel aromático. Contudo, Gallucci *et al.* (2014) referem que por si só a presença do hidroxil fenólico não é suficiente para fornecer propriedades antifúngicas aos fenóis.

O carvacrol e o timol afectam, além da integridade da membrana, a biossíntese de ergosterol de forma dependente da dose de maneira a diminuir o teor de ergosterol (Ahmad *et al.*, 2011; Suntres *et al.*, 2015). Ahmad *et al.* (2010) sugeriu que o timol e o carvacrol, ao penetrarem nas células fúngicas, têm como alvo a via de biossíntese do ergosterol, prejudicando a sua biossíntese de uma maneira semelhante à acção do fluconazol. Simultaneamente, o grupo hidroxil destes compostos reage com a membrana e o efeito destas duas situações combinadas leva a uma extensa lesão na membrana. No entanto, esta hipótese requer a identificação das enzimas alvo da via de biossíntese do ergosterol.

De Castro *et al.* (2015) sugeriram que o timol se liga ao ergosterol na membrana plasmática fúngica, promovendo o aumento da permeabilidade iónica o que resulta na morte celular. A configuração química de compostos como o timol confere-lhes propriedades hidrofóbicas e permite assentar em estruturas lipofílicas de microrganismos, como a membrana plasmática, levando a uma maior permeabilidade da membrana e consequente perda de electrólitos essenciais à sobrevivência celular.

O eugenol causa morte das células fúngicas por disrupção da integridade da membrana celular aos valores da CMI enquanto doses sub-CMI prejudicam significativamente o sistema de defesa de *C. albicans* (Gallucci *et al.*, 2014).

Não foi obtida actividade antifúngica por parte de alguns compostos naturais como o citronelal, nerolidol, α -pineno e linalool, mas, curiosamente, Raut *et al.* (2013) reportam que compostos como o linalool exibem uma actividade anti-biofilme com concentrações muito mais baixas do que a CMI de células planctónicas.

4.2. Susceptibilidade de *Candida* spp. ao carvacrol, eugenol, timol, fluconazol e voriconazol

A literatura é escassa e, por vezes, contraditória acerca da acção de compostos naturais sobre outras espécies de *Candida* comparativamente à espécie mais estudada (*C. albicans*). Ainda assim a maioria dos estudos reporta a acção do carvacrol, eugenol e timol como os compostos de maior interesse e com maior actividade antifúngica.

Estudos confirmam que altas concentrações de carvacrol presente em amostras de *Origanum virens* explicam a actividade antifúngica deste óleo essencial em espécies de *Candida* (Palmeira-de-Oliveira *et al.*, 2009). Ahmad *et al.* (2011) reportaram uma acção antifúngica do carvacrol e do timol em estirpes clínicas provenientes de todos os locais importantes de infecção (cutânea, broncoalveolar, orofaríngea e esofágica, e de casos como candidémia, infecções vulvovaginais de pacientes com e sem VIH). Em estirpes com susceptibilidade ao fluconazol (que incluem *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. parapsilosis*) apresentam uma CMI média de 75-90 mg/L para o carvacrol e 100-125 mg/L para o timol. No caso de estirpes com resistência ao fluconazol (que incluem *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* e *C. krusei*) apresentam CMIs de 75-100 mg/L (carvacrol) e 100-150 mg/L (timol). Tendo em conta as mesmas espécies, os resultados aqui apresentados para o carvacrol e timol variam de 32-128 mg/L e 64-256 mg/L, respectivamente, que estão em parte de acordo com os resultados obtidos por Ahmad *et al.* (2011). Neste estudo, introduzimos ainda *C. guilliermondii* que apresentou a CMI mais baixa para o timol (32 mg/L).

Neste estudo, o eugenol apresenta actividade antifúngica contra as várias estirpes de *Candida*, à excepção de *C. albicans* SER7. Mas, no que toca a estirpes com resistência ao fluconazol a sua actividade antifúngica, em geral, é menor do que comparada com o carvacrol e o timol, como acontece com *C. krusei* 5/11, *C. krusei* 282/09, *C. albicans* SER7, *C. glabrata* 50/14 e *C. glabrata* 531/14. Outros autores já tinham reportado o efeito antifúngico do eugenol contra *C. krusei* (Galluci *et al.*, 2014; Marcos-Arias *et al.*, 2011), *C. glabrata* (Marcos-Arias *et al.*, 2011; Mandras *et al.*, 2016), *C. guilliermondii* e *C. albicans* (Marcos-Arias *et al.*, 2011) mas com resultados diferentes dos obtidos neste trabalho.

Os testes de diluições em série em meio líquido são recomendados para o estudo do efeito inibitório de substâncias naturais e são um método padronizado. No entanto, é importante sublinhar que os dados da actividade antimicrobiana dos compostos naturais dependem da metodologia utilizada, cuja variabilidade inclui factores como o tamanho do inóculo, o meio utilizado, tempo de incubação e o uso de selantes, surfactantes e solventes, como Tween, dimetilsulfóxido e etanol (Pauli e Schilcher, 2010). Em parte, isto poderá explicar as diferenças nos resultados obtidos por diferentes grupos de investigação.

4.3. Sinergia na actividade antifúngica entre os compostos naturais, fluconazol e voriconazol

Os métodos que são usados para estudar combinações antifúngicas *in vitro* têm diferido ao longo do tempo entre investigadores, sendo que vão surgindo testes mais sofisticados e que poupem tempo no laboratório (p.e. as tiras *E-test*), mas todos os métodos podem ser reduzidos a dois elementos: i) um modelo conceitual para prever o resultado esperado para uma combinação, e ii) designações usadas para categoriza os resultados que são melhores do que o esperado, pior do que o esperado, ou como esperado (Johnson *et al.*, 2014).

Não se pode assumir que o uso de dois ou mais compostos eficazes com diferentes mecanismos de acção produzam melhores resultados do que quando usados em separado. A terapia antifúngica combinada pode reduzir a morte microbiana e a eficácia clínica, aumentar o potencial de interacções e toxicidade de medicamentos e levar a um custo muito maior de despesas com medicamentos antifúngicos sem benefício clínico comprovado (Johnson *et al.*, 2004). A terapia combinada de agentes antifúngicos disponíveis é recomendada e usada para tratamento de várias micoses, no entanto, a terapia combinada com compostos naturais tem sido pouco explorada (Khan e Ahmad, 2011).

Um dos métodos conhecidos e mais usados para investigar a actividade antimicrobiana de agentes sintéticos ou naturais é o *checkerboard*, que fornece uma disposição bidimensional de diferentes concentrações de substâncias e permite o cálculo do CIF, que é necessário para avaliar o sinergismo ($CIF \leq 0,5$), indiferença ($0,5 > CIF \leq 2$) ou antagonismo ($CIF > 2$) das combinações (De Castro *et al.*, 2015).

Ahmad *et al.* (2010) reportaram que em todas as estirpes de *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* e *C. krusei*, em estudo, houve uma diminuição das CMI de eugenol e fluconazol quando combinados.

Neste trabalho foi possível observar que tanto em *C. krusei* como *C. glabrata* há um efeito sinérgico quando os compostos naturais carvacrol e eugenol estão combinados com os agentes antifúngicos fluconazol e voriconazol, mas o mesmo não acontece com o timol. Estudos recentes reportaram resultados semelhantes aos obtidos neste estudo, em que o carvacrol e o eugenol, mas não o timol, sinergizam com o

fluconazol e inibem o crescimento de células planctónicas e também biofilmes em estirpes clínicas resistentes (Challoy *et al.*, 2015; Doke *et al.*, 2014).

Na literatura não foram encontrados quaisquer resultados de testes semelhantes de compostos naturais com o voriconazol de modo a fazer uma comparação. Alguns estudos reportam testes realizados com voriconazol em várias estirpes de *Candida*, principalmente *C. albicans*, em separado de compostos naturais mas não em combinação, não sendo possível fazer uma comparação de modo a avaliar o efeito destas combinações em células planctónicas. A maioria dos estudos foca-se no fluconazol visto que este é usado no tratamento de *Candida* e são muitos os casos de estirpes que adquirem resistência a este antifúngico, e o voriconazol é usado como reserva no caso dessas resistências.

De qualquer forma pela análise do CIF é possível observar um efeito sinérgico deste agente antifúngico quando combinado com carvacrol (*C. krusei* 5/11 e *C. glabrata* 531/14) e com eugenol (*C. parapsilosis* 246/11, *C. krusei* 5/11 e *C. glabrata* 531/14) mas não com o timol.

São vários os mecanismos possíveis envolvidos na actividade sinérgica de agentes antifúngicos: i) a inibição de diferentes fases nas vias intracelulares fúngicas que são essenciais para a sobrevivência celular; ii) o aumento da entrada de um agente antifúngico na célula resultante da acção de outro agente antifúngico na membrana celular fúngica; iii) a inibição de proteínas transportadoras; iv) a inibição simultânea de diferentes alvos, e v) a potente actividade fungicida de um agente antifúngico para reduzir a carga fúngica, o que permite a acção posterior do outro agente antifúngico na remoção de um número menor de células (Johnson *et al.*, 2004; De Castro *et al.*, 2015).

O mecanismo de acção da combinação dos agentes antifúngicos com os compostos naturais deve envolver a inibição da formação de ergosterol como o resultado da acção dos agentes antifúngicos nas diferentes enzimas envolvidas na biossíntese do ergosterol e/ou porque há um aumento da permeabilidade celular que permite passagem de um ou ambos os compostos causando a degradação da parede celular e outros efeitos como a ruptura da membrana plasmática (Pemmaraju *et al.*, 2013; De Castro *et al.*, 2015).

4.4. Inibição *in vitro* de biofilmes de *Candida albicans* SER7

Para o estudo do efeito inibitório de compostos naturais em biofilmes foi estudada a estirpe *C. albicans* SER7 com recurso ao método de redução do XTT num modelo de microplaca de 96 poços desenvolvido por Pierce *et al.* (2008). Alguns autores já tinham demonstrado previamente a utilidade deste método em estirpes de *C. albicans* (Taff *et al.*, 2012) e em *C. glabrata* e *Candida dubliniensis* (Ramage *et al.*, 2001), sendo um método preciso e eficiente na medição da actividade metabólica de biofilmes. Zahran *et al.* (2010) relataram a fiabilidade deste método na quantificação da actividade de biofilmes, visto que a actividade celular medida pelo XTT está associada linearmente ao número de células.

No entanto, existem algumas ressalvas e limitações no uso deste reagente e metodologia. Os resultados que comparem a capacidade de formação de biofilmes por diferentes isolados devem ser interpretados com cuidado visto que já foi reportado que diferentes espécies fúngicas e mesmo estirpes da mesma espécie mostram diferenças na capacidade de metabolizar o XTT (Pierce *et al.*, 2008). Também alterações nas fases metabólicas durante diferentes fases da formação de biofilmes, pode levar a flutuações na capacidade das células no interior do biofilme metabolizarem o XTT. Como células de biofilme estão incluídas numa matriz extracelular, isto pode possivelmente impor uma limitação de acesso a nutrientes e oxigénio, resultando em alterações na actividade celular (Zahran *et al.*, 2015).

O fluconazol, usado como antifúngico padrão neste trabalho, apenas foi eficaz contra os biofilmes de *C. albicans* SER7 a uma concentração mais de 50 vezes superior à obtida em crescimento de células planctónicas (Tabela 26). A adição do carvacrol ao fluconazol mostrou um efeito sinérgico dos dois compostos contra os biofilmes. Isto foi evidente a partir da redução significativa da actividade metabólica analisada pelo teste de XTT.

Doke *et al.* (2008) reportaram os efeitos do carvacrol na prevenção da formação de biofilmes e em biofilmes maduros de *C. albicans*, sendo que este foi o composto mais eficiente. Quando combinado com o fluconazol era possível observar o efeito sinérgico dos dois compostos na prevenção dos biofilmes. Foram também testados o eugenol e o timol e concluíram que o timol e o fluconazol não tinham interacção um

com o outro contra a formação de biofilmes e em biofilmes maduros. Os resultados reportados relativamente ao eugenol foram inferiores comparativamente ao carvacrol.

Estes resultados de interação dos compostos naturais com os agentes antifúngicos descritos por Doke *et al.* (2008) são semelhantes aos que foram obtidos na fase anterior (sinergia de compostos), no sentido em que muitas vezes o carvacrol foi o composto com melhor actividade e o facto de que o timol raramente apresenta um efeito sinérgico quando em combinação com agentes antifúngicos. Isto talvez indique que os mecanismos de acção responsáveis pelo efeito sinérgico da combinação dos compostos em células planctónicas serão os mesmos que estão por detrás do efeito sinérgico em biofilmes. No entanto, neste trabalho, os resultados dos testes de combinação em células planctónicas e biofilmes para a espécie *C. albicans* SER7 foram diferentes, sendo que em células planctónicas, em geral, não foi observado efeito sinérgico dos compostos quando combinados, enquanto que em biofilmes o efeito sinérgico foi bastante notório. Apesar dos resultados aqui obtidos serem interessantes é necessário averiguar quais os mecanismos de acção responsáveis pelo efeito inibitório quando os compostos estão combinados e de que forma eles interagem com os diferentes tipos de crescimento de *Candida*.

Os resultados obtidos relativamente à inibição de crescimento das células sésseis em 80% (Tabela 27) também são interessantes. Como já mencionado anteriormente, seria de esperar que M1 fosse a combinação com melhores resultados, tendo em conta que a concentração de carvacrol para inibir 80% do crescimento individualmente é muito maior que a de fluconazol. No entanto, as combinações com maior concentração de carvacrol revelaram um maior efeito sinérgico sugerindo que o carvacrol tem algum tipo de contribuição para estes resultados quando combinado com o fluconazol. Isto acontece talvez devido à acção fungicida do carvacrol (Khan e Ahmad, 2011) sobre a acção fungistática do fluconazol.

Dalleau *et al.* (2008) reportaram também que o carvacrol foi o composto mais eficiente e capaz de induzir uma inibição superior a 75% do biofilme de *C. albicans* independentemente da idade do biofilme tratado e da concentração de carvacrol testada. Foi também capaz de induzir uma inibição de biofilmes de *C. glabrata* e de *C. parapsilosis*, quando usado numa concentração mais elevada. Estes resultados sugerem que a actividade do carvacrol contra biofilmes não é apenas restrita a *C. albicans*.

4.5. Considerações Finais

Apesar da introdução de agentes antifúngicos melhorados para tratamento e profilaxia, as IFI continuam a ser um problema clínico sério. As infecções causadas por organismos como as leveduras geralmente apresentam mais dificuldades terapêuticas do que as infecções bacterianas. Existem poucos agentes antifúngicos que identificam um único alvo que não é partilhado com o hospedeiro humano, originando problemas de toxicidade destes fármacos.

Os tratamentos actuais são eficazes, mas estão a emergir estirpes resistentes e intrinsecamente resistentes a estes tratamentos. O custo de tratamento associado com a citotoxicidade e o facto de a maioria dos agentes antifúngicos disponíveis apresentarem apenas actividade fungistática tem levado à procura de novas estratégias terapêuticas.

Os produtos naturais proporcionam uma fonte de moléculas com várias propriedades incluindo propriedades antifúngicas.

Este trabalho teve como objetivo o estudo de vários compostos naturais seleccionados com propriedades antifúngicas previamente descritas na literatura e avaliar seu efeito de inibição tanto em células de culturas planctónicas como em biofilmes de estirpes de *Candida* clinicamente relevantes.

São poucos os estudos que avaliam os efeitos dos compostos naturais em leveduras, sendo que o grande foco dos trabalhos é sobre bactérias e pouco se sabe sobre o efeito destes em fungos. Os óleos essenciais das plantas variam consoante o clima, qualidade do solo e outros factores como os genéticos, sendo necessário fazer uma caracterização prévia da composição do óleo essencial. Dos trabalhos publicados sobre efeito de compostos naturais em microrganismos, muitas vezes são estudados os extratos de óleos essenciais de plantas em crú, sem nenhum tipo de separação de compostos de forma a poder avaliar qual dos compostos presentes nestes óleos essenciais será o responsável pelo efeito inibitório. No entanto, algumas publicações identificam estes compostos activos principais dos óleos essenciais e demonstram que são muito mais eficazes individualmente contra microrganismos, do que o complexo de compostos que formam os óleos essenciais das plantas.

Estas razões motivaram o estudo dos principais constituintes de alguns óleos essenciais de plantas do dia-a-dia para avaliar o efeito destas simples pequenas

moléculas em leveduras que causam grandes problemas clínicos e que já apresentam dificuldades terapêuticas devido a resistências, como é o caso de *Candida*. O estudo do efeito dos compostos activos dos óleos essenciais em biofilmes de microrganismos é também uma área muito pouco estudada. O facto de *Candida* crescer em biofilme, em várias superfícies como dispositivos médicos, e de serem uma forma de crescimento que apresenta maior resistência e dificuldade de tratamento por parte de agentes antifúngicos sintéticos motivou também o estudo dos compostos naturais em biofilmes.

Os resultados obtidos neste trabalho demonstram a actividade antifúngica de alguns dos compostos naturais na inibição do crescimento de *Candida*. Os compostos naturais que apresentaram melhores resultados na inibição do crescimento de várias estirpes de *Candida* foram o carvacrol, o eugenol e o timol. Curiosamente independentemente da espécie ou estirpe em estudo e do nível de resistência que estas apresentavam aos agentes antifúngicos em estudo, as CMI destas estirpes em relação aos três compostos naturais mencionados não variavam muito, sendo maioritariamente entre 64 mg/L e 256 mg/L. Isto indica que talvez as estirpes não tenham mecanismos de defesa que combatam o efeito destes compostos sobre as suas células, porque se tivessem seria de esperar observar um grande espectro de diferentes CMI.

Os testes *in vitro*, que avaliam o efeito sinérgico dos agentes antifúngicos com os compostos naturais, sugerem o uso de combinações destes compostos como estratégia de tratamento de infecções causadas por *Candida*, incluindo as estirpes com resistência agentes antifúngicos. Ou seja, este estudo não sugere o uso dos compostos naturais em substituição dos agentes antifúngicos que existem já disponíveis para tratamento de infecções, mas sim o seu uso combinado. Desta forma seria possível ter mais alvos de actuação por parte dos compostos contra *Candida* e a diminuir a toxicidade associada aos agentes antifúngicos.

Os mecanismos de acção dos compostos naturais ainda não foram muito estudados e muito menos os mecanismos que tornam a combinação dos agentes antifúngicos com os compostos naturais uma sugestão tão apelativa ao seu uso em terapia combinada. Contudo, alguns estudos indicam que o principal mecanismo de acção dos compostos naturais deve-se aos efeitos prejudiciais na membrana celular dos microrganismos. Desta maneira são capazes de facilitar a permeabilidade de fármacos hidrofílicos e lipofílicos devido ao aumento da permeabilidade da membrana. No

entanto, neste estudo foram observadas algumas diferenças entre espécies, pelo que será necessário efectuar estudos de sinergia em outras estirpes e averiguar quais os mecanismos exatos responsáveis pelo efeito sinérgico destes compostos e de que maneira actuam em diferentes espécies de *Candida*.

Foi também demonstrado o efeito dos compostos naturais isoladamente e em combinação com agentes antifúngicos contra biofilmes de *Candida albicans*, sendo observada uma inibição do crescimento e um grande efeito sinérgico quando os compostos estavam combinados.

Mais uma vez, apesar de actualmente não serem claros os mecanismos de acção da sinergia de fluconazol e carvacrol, este estudo indica que a combinação destes compostos resulta numa sensibilidade aumentada das células do biofilme relativamente ao fluconazol. É necessário efectuar estudos que identifiquem os mecanismos de acção dos compostos naturais sobre os biofilmes e averiguar se são os mesmos mecanismos que estão por detrás da inibição do crescimento de células planctónicas de *Candida*, tanto quando os compostos são testados isoladamente como em combinação com os agentes antifúngicos.

Apesar do carvacrol ser activo em combinação com o fluconazol em concentrações relativamente baixas que não exibem toxicidade, alguns autores não sugerem o seu uso directo (Doke *et al.*, 2014). É necessário efectuar estudos toxicológicos que avaliem a acção deste e de outros compostos naturais promissores, no tratamento de infecções de *Candida*, *in vivo*.

O carvacrol é o composto natural mais promissor deste estudo. As características deste composto, como a baixa toxicidade, solubilidade e a facilidade de obtenção, são também factores responsáveis pelo destaque do monoterpenóide aromático neste estudo.

O carvacrol já é utilizado em pequenas concentrações na comida, mas o seu potencial clínico implica a utilização de doses potencialmente maiores. A informação toxicológica deste composto é limitada e poucos são os testes que avaliam os seus efeitos. Testes feitos em laboratório mostraram que é lentamente absorvido nos intestinos de coelhos, permanecendo cerca de 30% no tubo gastrointestinal e 25% excretado pela urina, 22h após a administração oral. A distribuição do carvacrol é feita pelo estômago, intestinos e urina, e em pequenas quantidades nos pulmões, fígado e músculo. Testes em ratos Wistar machos mostraram que a excreção urinária dos

metabolitos de carvacrol e timol é rápida e após 48-72h não foram detectados quaisquer metabolitos nas amostras. Alguns estudos reportam a dose letal mediana (DL₅₀) do carvacrol em ratos por diferentes vias de administração: 810 mg/kg (oral), 680 mg/kg (subcutânea), 80 mg/kg (intravenosa) e 73 mg/kg (intraperitoneal) (Anderson, 2006; Friedman, 2014; e Suntres *et al.*, 2015). Outros estudos reportam que o carvacrol não tem efeitos genotóxicos e que a sua administração singular não tem qualquer efeito de dano no DNA, aliás, tem uma acção protectora contra o dano de DNA nos hepatócitos de ratos tratados com D-galactosamina ou expostos a azul de metileno excitado com luz visível (Suntres *et al.*, 2015). Existem algumas publicações que avaliam os efeitos citotóxicos de carvacrol e timol (Ahmad *et al.*, 2010) e de eugenol (Khan e Ahmad, 2011) em glóbulos vermelhos humanos, visto ser um método fácil para estudar a toxicidade de compostos através da medição de hemoglobina libertada, e os resultados indicaram que estes três compostos são significativamente menos citotóxicos do que os antifúngicos convencionais (anfotericina B e fluconazol), mesmo em concentrações mais elevadas (2000 mg/L).

A preocupação com os possíveis danos na saúde e a resistência que os microrganismos apresentam aos fármacos tradicionais têm dado grande destaque aos compostos naturais. Embora a toxicidade dos compostos naturais necessite de ser avaliada *in vivo*, muitos são constituintes de especiarias e são já utilizados na alimentação humana sendo geralmente reconhecidos como seguros (GRAS) (Pauli, 2006). Assim estes compostos de origem vegetal poderão vir a ser empregues em novas estratégias terapêuticas para a prevenção e erradicação de biofilmes de *Candida*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguiar, R., Ootani, M., Ascencio, S., Ferreira, T., Santos, M., and Santos, G. 2014. Fumigant antifungal activity of *Corymbia citriodora* and *Cymbopogon nardus* essential oils and citronellal against three fungal species. The Scientific World Journal. 2014, 492138 doi: 10.1155/2014/492138
- Ahmad, A., Khan, A., Akhtar, F., Yousuf, S., Xess, I., Khan, L., Manzoor, N. 2011. Fungicidal activity of thymol and carvacrol by disrupting ergosterol biosynthesis and membrane integrity against *Candida*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. **30**:41-50 doi 10.1007/s10096-010-1050-8
- Ahmad, A., Khan, A., Khan, L., and Manzoor, N. 2010. *In vitro* synergy of eugenol and methyleugenol with fluconazole against clinical *Candida* isolates. Journal of Medical Microbiology. **59**, 1178-1184
- Ahmad, A., Wani, MY., Khan, A., Manzoor, N., and Molepo, J. 2015. Synergistic interactions of eugenol-tosylate and its congeners with fluconazole against *Candida albicans*. PLoS One. 10:e0145053
- Almeida, A., Mesquita, C., Svidzinski, T., and Oliveira, K. 2013. Antifungal susceptibility and distribution of *Candida* spp. isolates from the University Hospital in the municipality of Dourados, State of Mato Grosso do Sul, Brazil. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, **46**(3), 335-339.
- Alviano, WS., Mendonça-Filho, RR., Alviano, DS., Bizzo, HR., Souto-Prado, T., Rodrigues, ML., Bolognese, AM., Alviano, CS., Souza, MM. 2005. Antimicrobial activity of *Croton cajucara* Benth linalool-rich essential oil on artificial biofilm and planktonic microorganisms. Oral Microbiology Immunology. **20**:101-105
- Anderson, A. 2006. Final report on the safety assessment of sodium p-chlorom-cresol, p-chloro-m-cresol, chlorothymol, mixed cresols, m-cresol, o-cresol, p-cresol, isopropyl cresols, thymol, o-cymen-5-ol, and carvacrol. Int J Toxicol **25**(Suppl 1):29-127
- Arendrup, MC. 2013. *Candida* e candidaemia. Susceptibility and epidemiology. Dan Med J. **60**(1): B4698

- Arendrup, MC., Guinea, J., Cuenca-Estrella, M., Meletiadis, J., Mouton, JW., Lagrou, K., Howard, SJ., and the Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing (AFST) of the ESCMID European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). 2015. EUCAST definitive document E.DEF 7.3: Method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for yeasts. http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/AFST/Files/EUCAST_E_Def_7_3_1_Yeast_testing_definitive.pdf
- Atkinson, R. 2017. Phenylpropenes: Occurrence, Distribution, and Biosynthesis in Fruit. *J Agric Food Chem.* **17**. doi: 10.1021/acs.jafc.6b04696
- Batovska, D., Parushev, St., Slavova, A., Bankova, V., Tsvetkova, I., Ninova, M., Najdenski, H. 2007. Study on the substituents' effects of a series of synthetic chalcones against the yeas *Candida albicans*. *European Journal of Medical Chemistry.* **42**, 87-92
- Baumann, K., Adelantado, N., Lang, C., Mattanovich, D., and Ferrer, P. 2011. Protein trafficking, ergosterol biosynthesis and membrane physics impact recombinant protein secretion in *Pichia pastoris*. *Microb Cell Fact.* **10**, 93. doi 10.1186/1475-2859-10-93
- Beier, RC., Byrd, JA 2nd, Kubena, LF., Hume, ME., McReynolds, JL., Anderson, RC., and Nisbet, DJ. 2014. Evaluation of linalool, a natural antimicrobial and insecticidal essential oil from basil: effects on poultry, *Poult Sci.* **93**:267-72
- Bermejo, DV., Angelov, I., Vicente, G., Stateva, RP., Garcia-Risco, MR., Reglerp, G., Ibañez, E., and Fornari, T. 2015. Extraction os thymol from different varieties of thyme plants using green solvents. *J Sci Food Agric.* **95**:2901-7
- Bitar, D., Lortholary, O., Strat, Y., Nicolau, J., Coignard, B., Tattevin, P., Che, D., and Dromer, F. 2014. Population-based analysis of invasive fungal infections, France, 2001-2010. *Emerg Infect Dis.* **20**(7): 1149-1155
- Braga, PC., Alfieri, M., Culici, M., and Dal Sasso, M. 2007. Inhibitory activity of thymol against the formation and viability of *Candida albicans* hyphae. *Mycoses.* **50**(6): 502-6. doi:10.1111/j.1439-0507.2007.01412.x

- Braga, PC., Sasso, MD., Culici, M., and Alfieri, M 2007. Eugenol and thymol, alone or in combination, induce morphological alterations in the envelope of *Candida albicans*. *Fitoterapia*. **78**(6):396-400
- Cavalcanti, Y., Almeida, L., and Padilha, W. 2011. Atividade Antifúngica de Três Óleos Essenciais sobre Cepas de *Candida*. *Rev Odontol Bras Central*. **20**(52)
- Chaillot, J., Tebbji, F., Remmal, A., Boone, C., Brown, GW., Bellaoui, M., and Sellam, A. 2015. The Monoterpe Carvacrol Generates Endoplasmic Reticulum Stress in the Pathogenic Fungus *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother*. **59**(8):4584-92
- Chan, WK., Tan, LT., Chan, KG., Lee, LH, and Goh, BH. 2016. Nerolidol: a sesquiterpene alcohol with multi-faceted pharmacological and biological activities. *Molecules*. **21**(5)
- Chandra, J., and Mukherjee, PK. 2015. *Candida* biofilms: development, architecture, and resistance. *Microbiology spectrum*. **3**(4):10.1128
- Coleman, J., Okoli, I., Tegos, G., Holson, E., Wagner, F., Hamblin, M., and Mylonakis, E. 2010. Characterization of plant-derived saponin natural products against *Candida albicans*. *ACS Chem Biol*. **5**: 321-332
- Cosentino, S., Tuberoso, CIG., Pisano, B., Satta, M., Mascia, V., Arzedi, E., and Palmas, F. 1999. *In-vitro* antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian *Thymus* essential oils. *Letters in Applied Microbiology*. **29**: 130-135
- Curvelo, J., Marques, A., Barreto, A., Romanos, M., Portela, M., Kaplan, M., and Soares, R. 2014. A novel nerolidol-rich essential oil from *Piper clausenianum* modulates *Candida albicans* biofilm. *Journal of Medical Microbiology*. **63**, 697-702
- Dalleau, S., Cateau, E., Bergès, T., Berjeaud, J., and Imbert, C. 2008. *In vitro* activity of terpenes against *Candida* biofilms. *Int Journal of Antimicrob Agents*. **31**, 572-576
- De Castro, R., Souza, T., Bezerra, L., Ferreira, G., Costa, E., and Cavalcanti, A. 2015. Antifungal activity and mode of action of thymol and its synergism with nystatin against *Candida* species involved with infections in the oral cavity: an

in vitro study. BCM Complement Altern Med. **15**:417. doi: 10.1186/s12906-015-0947-2

- De Toledo, LG., Ramos, M., Spósito, L., Castilho, E., Pavan, F., Lopes, E., Zocolo, G., Silva, F., Soares, T., Santos, A., Bauab, T., and De Almeida, M. 2016. Essential Oil of *Cymbopogon nardus* (L.) Rendle: A Strategy to Combat Fungal Infections Caused by *Candida* Species .Int J Mol Sci. **17**, 1252
- Deorukhkar, S., and Saini, S. 2016. Why *Candida* species have emerged as important nosocomial pathogens?. Int J Curr Microbiol App Sci. **5**(1): 533-545
- Doke, SK., Raut, JS., Dhawale, S., and Karuppayil, SM. 2014. Sensitization of *Candida albicans* biofilms to fluconazole by terpenoids of plant origin. J Gen Appl Microbiol. **60**, 163-168
- Dorman, H and Deans, S. 2000. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. Journal of Applied Microbiology. **88**, 308-316
- Egbuta, C., Lo, J., & Ghosh, D. (2014). Mechanism of Inhibition of Estrogen Biosynthesis by Azole Fungicides. Endocrinology. **155**(12), 4622–4628
- Eggimann, P., Garbino, J., Pittet, D. 2003. Epidemiology of *Candida* species infections in critically ill non-immunosuppressed patients. Lancet Infect Dis. **3**, 685-702.
- Egunsola, O., Adefurin, A., Fakis, A., Jacqz-Aigrain, E., Choonara, I., and Sammons, H. (2013). Safety of fluconazole in paediatrics: a systematic review. European Journal of Clinical Pharmacology. **69**(6), 1211–1221. <http://doi.org/10.1007/s00228-012-1468-2>
- Elewa, H., El-Mekaty, E., El-Bardissy, A., Ensom, MH. and Wilby, KJ. 2015. Therapeutic Drug Monitoring of Voriconazole in the Management of Invasive Fungal Infections: A Critical Review. Clin Pharmacokinet. **54**(12): 1223-35. doi:10.1007/s40262-015-0297-8
- Esquivel, B. D., Smith, A. R., Zavrel, M., and White, T. C. (2015). Azole Drug Import into the Pathogenic Fungus *Aspergillus fumigatus*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. **59**(6), 3390–3398
- Faria-Ramos, I., Neves-Maia, J., Ricardo, E., Santos-Antunes, J., Silva, AT., Costa-de-Oliveira, S., Cantón, E., Rodrigues, AG. and Pina-Vaz, G. 2014. Species distribution and *in vitro* antifungal susceptibility profiles of yeast

isolates from invasive infections during Portuguese multicenter survey. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. **33**(12): 2241-7

- Freitas, G., and Frade, J. 2014. Agentes Antifúngicos in Cap VI - Micologia Médica *In Microbiologia Médica Vol 2* (ed.), Barroso, H., Meliço-Silvestre, A., and Taveira, N. Lidel - Edições Técnicas Lda., Lisboa
- Friedman, M. 2014. Chemistry and multibeneficial bioactivities of carvacrol (4-isopropyl-2-methylphenol), a component of essential oils produced by aromatic plants and species. J Agric Food Chem. **62**(31):7652-70 doi: 10.1021/jf5023862
- Gabardi, S., Kubiak, DW., Chandraker, AK. and Tullius, SG. 2007. Invasive fungal infections and antifungal therapies in solid organ transplant recipients. Transplant International. Transplant International. **20**, 993–1015.
- Gallucci, MN., Carezzano, ME., Oliva, MM., Demo, MS., Pizzolitto, RP., Zunino, MP., Zygodlo, JA., and Dambolena, JS. 2014. *In vitro* activity of natural phenolic compounds against fluconazole-resistant *Candida* species: a quantitative structure-activity relationship analysis. J Appl Microbiol. **116**:795-804
- Guo, N., Liu, J., Wu, X., Bi, X., Meng, R., Wang, X., Xiang, H., Deng, X., and Yu, L. 2009. Antifungal activity of thymol against clinical isolates of fluconazole-sensitive and -resistant *Candida albicans*. J Med Microbiol. **58**(Pt8): 1074-9. doi: 10.1099/jmm.0.008052-0
- Gupta, A., Schauvinhold, I., Pichersky, E., and Schiestl, F. 2014. Eugenol synthase genes in floral scent variation in *Gymnadenia* species. Funct Integr Genomics. **14**:779-788
- Halbandge, SD., Mortale, SP., Jadhav, AK., Kharat, K., and Karuppayil, SM. 2017. Different Sensitivities of various growth modes of *Candida albicans* to sixteen molecules of plant origin. Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry. **6**(4): 306-318
- Hasan, F., Xess, I., Wang, X., Jain, N. and Fries, B. 2009. Biofilm formation in clinical *Candida* isolates and its association with virulence. Microbes Infect. **11**(8-9): 753-761
- He, M., Du, M., Fan, M., and Bian, Z. 2007. *In vitro* activity of eugenol against *Candida albicans* biofilms. Mycopathologia. 163:137-143

- Hsu, CC., Lai, WL., Chuang, KC., Lee, MH., Tsai, Yc. 2013. The inhibitory activity of linalool against the filamentous growth and biofilm formation in *Candida albicans*. *Med Mycol.* **51**:473-82
- Hyldgaard, M., Mygind, T., and Meyer, L. 2012. Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. *Frontiers in Microbiology.* **3**:12 doi: 10.3389/fmicb.2012.00012
- Jamali, CA., El Bouzidi, L., Bekkouche, K., Lahcen, H., Markouk, M., Wohlmuth, H., Leach, D., and Abbad, A. 2012. Chemical composition and antioxidant and anticandidal activities of essential oils from different wild Moroccan *Thymus* species. *Chem Biodivers.* **9**(6): 1188-97
- Javed, H., Azimullah, S., Abul Khair, SB., Ojha, S., and Haque, ME. 2016. Neuroprotective effect of nerolidol against neuroinflammation and oxidative stress induced by rotenone. *BMC Neuroscience.* **17**(1), 58
- Johnson, M., MacDougall, C., Ostrosky-Zeichner, L., Perfect, J and Rex, J. 2004. Combination Antifungal Therapy. *Antimicrob Agents Chemother.* **48**(3): 693-715. doi: 10.1128/AAC.48.3.693-715.2004
- Khan, MS., and Ahmad, I. 2011. Antifungal activity of essential oils and their synergy with fluconazole against drug-resistant strains of *Aspergillus fumigatus* and *Trichophyton rubrum*. *Appl Microbiol Biotechnol.* **90**(3): 1083-94. doi: 10.1007/s00253-011-3152-3
- Kim, DS., Lee, HJ., Jeon, YD., Han, YH., Kee, JY., Kim, HJ., Shin, HJ., Kang, J., Lee, BS., Kim, SH., Kim, SJ., Park, SH., Choi, BM., Park, SJ., Um, JY., and Hong, SH. 2015. Alpha-Pinene Exhibits Anti-inflammatory activity through the suppression of MAPKs and the NF- κ B pathway in mouse peritoneal macrophages. *Am J Chin Med.* **43**(4): 731-42
- Kim, YS., Kim, KS., Han, I., Jung, MH., and Park, HK. 2012. Quantitative and Qualitative Analysis of the Antifungal Activity of Allicin Alone and in Combination with Antifungal Drugs. *PLoS One.* **7**(6): 236242. doi: 10.1371/journal.pone.0038242
- Kon, K., and Rai, M. 2013. Combining Plant Essential Oils and Antimycotics in Coping with Antimycotic-Resistant *Candida* Species in Cap 9 - Antifungal

Metabolites from Plants (eds), Razzaghi-Abyaneh, M., and Rai, M., Springer Heidelberg, New York. doi: 10.1007/978-3-642-38076-1_1

- Lohse, M., Gulati, M., Johnson, A., and Nobile, C. 2018. Development and regulation of single- and multi-species *Candida albicans* biofilms. Nat Rev Microbiol. **16**: 19-31 doi : 10.1038/nrmicro.2017.107
- López-Martínez, R. (2010) Candidosis, a new challenge. Clinics in Dermatology. **28**, 178-184
- Loures, F and Levitz, S. 2016. XTT Assay of Antifungal Activity. Bio Protoc. **5**(15) e1543
- Ma, J., Xu, H., Wu, J., Qu, C., Sun, F., and Xu, S. 2015. Linalool inhibits cigarette smoke-induced lung inflammation by inhibition NF-kB activation. Int Immunopharmacol. **29**:708-713
- Mahboubi, M., and Ghazian Bidgoli, F. 2010. *In vitro* synergistic efficacy of combination of amphotericin B with *Myrtus communis* essential oil against clinical isolates of *Candida albicans*. Phytomedicine. **17**(10): 771–774. doi: 10.1016/j.phymed.2010.01.016
- Malani, A., Kerr, L., and Kauffman C. 2015. Voriconazol: How to use this antifungal agent and what to expect. Semin Respir Crit Care Med. **36**(5):786-95. doi: 10.1055/s-0035-1562903
- Mandras, N., Nostro, A., Roana, J., Scalas, D., Banche, G., Ghisetti, V., Re, S., Fucale, G., Cuffini, AM., and Tullio, A. 2016. Liquid and vapour-phase antifungal activities of essential oils against *Candida albicans* and non-*albicans* *Candida*. BMC Complementary and Alternative Medicine. **16**(1): 330
- Marcos-Arias, C., Eraso, E., Madariaga, L., and Quindós, G. 2011. *In vitro* activities of natural products against oral *Candida* isolates from denture wearers. BMC Complement Altern Med. **11**:119 doi 10.1186/1472-6882-11-119
- Marks, D., Liu, Q., and Slavin, M. 2017. Voriconazole for prophylaxis of invasive fungal infections after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. Expert Review of Anti-infective Therapy. **15**:5, 493-502. doi: 10.1080/14787210.2017.1305886

- Martinez-Rossi, N., Peres, N., and Rossi, A. 2008. Antifungal Resistance Mechanisms in Dermatophytes. *Mycopathologia*. **166**: 369-383 doi: 10.1007/s11046-008-9110-7
- Mathé, L., and Dijck, P. 2013. Recent insights into *Candida albicans* biofilm resistance mechanisms. *Curr Genet*. **59**(4) 251-264. doi 10.1007/s00294-013-0400-3
- Mitchell, K., Taff, H., Cuevas, M., Reinicke, E., Sanchez, H., and Andes, D. 2013. Role of matrix β -1,3 glucan in antifungal resistance of non-*albicans* *Candida* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother*. **57**(4): 1918-20. doi 10.1128/AAC.02378-12
- Nett, J., Lincoln, L., Marchillo, K., Massey, R., Holoyda, Hoff, B., VanHandel, M., and Andes, D. 2007. Putative Role of β -1,3 Glucans in *Candida albicans* Biofilm Resistance. *Antimicrob Agents Chemother*. **51**(2): 510-520. doi 10.1128/AAC.01056-06
- Nunes, D., Linck, V., Silva, A., Figueiró, M., and Elisabetsky, E. 2010. Psychopharmacology of Essential Oils in Cap 10.2 - Handbook of Essencial Oils: science, technology, and applications, Baser, K., and Buchbauer, G. CRC Press - Taylor & Francis Group, New York
- Orhan, G., Bayram, A., Zer, Y., and Balci, I. 2005. Synergy Test by E Test and Checkerboard Methods of Antimicrobial Combinations against *Brucella melitensis*. *J Clin Microbio*. **46**(1) 140-143. doi 10.1128/JCM.43.1.140-143.2005
- Ozseven, AG., Çetin, ES., and Ozseven, L. 2012. [Do differente interpretative methods used for evaluation of checkerboard synergy test affect the results?]. *Mikrobiyol Bul*. **46**(3): 410-20
- Palmeira-de-Oliveira, A., Salgueiro, L., Palmeira-de-Oliveira, R., Martinez-de-Oliveira, R., Pina-Vaz, C., Queiroz, JA., and Rodrigues, AG. 2009. Anti-*Candida* Activity of Essential Oils. *Mini-Reviews in Medical Chemistry*. **9**, 1292-1305
- Pauli, A. 2006. Anticandidal low molecular compounds from higher plants with speacial reference to copounds from essential oils. *Med Res Rev*. **26**: 223-268
- Pauli, A., and Schilcher, H. 2010. In vitro Antimicrobial Activities of Essential Oils Monographed in the European Pharmacopoeia 6th Edition in Cap 12 -

Handbook of Essential Oils: science, technology, and applications, Baser, K., and Buchbauer, G. CRC Press - Taylor & Francis Group, New York

- Pemmaraju, S., Pruthi, P., Prasad, R., and Pruthi, V. 2013. *Candida albicans* biofilm inhibition by synergistic action of terpenes and fluconazole. Indian J Exp Biol. **51**(11) 1032-1037
- Pfaller, MA., Diekema, DJ., and Sheehan, DJ. (2006). Interpretive Breakpoints for Fluconazole and *Candida* Revisited: a Blueprint for the Future of Antifungal Susceptibility Testing. Clinical Microbiology Reviews. **19**(2), 435–447. <http://doi.org/10.1128/CMR.19.2.435-447.2006>
- Pfaller, MA., Diekema, DJ. (2007). Epidemiology of Invasive Candidiasis: a Persistent Public Health Problem. Clin Microbiol Rev. **20**:133-163
- Pierce, CG., Uppuluri, P., Tristan, A., Woelmly Jr., FL., Mowat, E., Ramage, G., and Lopez-Ribot, JL. 2008. A simple and reproducible 96 well plate-based method for formation of fungal biofilms and its application to antifungal susceptibility testing. Nat Protoc. **3**(9): 1494-1500
- Pinto, E., Vale-Silva, L., Cavaleiro, C., and Salgueiro, L. 2009. Antifungal activity of the clove essential oil from *Syzygium aromaticum* on *Candida*, *Aspergillus* and dermatophyte species. J Med Microbiol. **5**(Pt11):1454-62
- Prasad, R., Banerjee, A., Khandelwal, N., and Dhamgaye, S. 2015. The ABCs of *Candida albicans* Multidrug Transporter Cdr1. Eukaryot Cell. **14**(12): 1154-64. doi 10.1128/EC.00137-15
- Ramage, G., Vande Walle, K., Wickes, BL., and López-Ribot, JL. 2001. Standardized Method for *In Vitro* Antifungal Susceptibility Testing of *Candida albicans* biofilms. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. **45** (9) : 2475-2479. doi:10.1128/AAC.45.9.2475-2479.2001.
- Raut, J., Bansode, BS., Jadhav, AK, and Karuppayil, SM. 2017. Activity of Allyl Isothiocyanate and Its Synergy with Fluconazole against *Candida albicans* Biofilms. J Microbiol Biotechnol. **27**(4): 685-693. doi: 10.4014/jmb.1607.07072
- Raut, J., Shinde, R., Chauhan, N., and Karuppayil, S. 2013. Terpenoids of plant origin inhibit morphogenesis, adhesion, and biofilm formation by *Candida albicans*. Biofouling. **29**, 87-96

- Reginato, CF., Bandeira, LA., Zanette, RA., Santurio, JM., Alves, SH., and Danesi, CC. 2017. Antifungal activity of synthetic antiseptics and natural compounds against *Candida dubliniensis* before and after *in vitro* fluconazole exposure. *Rev Soc Bras Med Trop.* **50**(1): 75-79
- Rodrigues, A., and Vaz, CP. 2014. Micoses Oportunistas in Cap VI - Micologia Médica *In Microbiologia Médica Vol 2* (ed.), Barroso, H., Meliço-Silvestre, A., and Taveira, N. Lidel - Edições Técnicas Lda., Lisboa.
- Sánchez, C., Aznar, R., and Sánchez, G. 2015. The effect of carvacrol on enteric viruses. *Int. J. Food Microbiol.* **192**:72-6
- Sanglard, D., and Coste, A. 2016. Activity of Isavuconazole and Other Azoles against *Candida* Clinical Isolates and Yeast Model Systems with Known Azole Resistance Mechanisms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* **60**(1), 229–238
- Santana, DP., Ribeiro, TF., Ribeiro, EL., Aquino, G., Neves, P. 2015. Ação de chalconas contra a formação de biofilme de *Candida albicans*. *Rev Ciênc Farm Básica Apl.* **36**(1):83-90
- Sardi, J., Scorzoni, L., Bernardi, T., Fusco-Almeida, AM. and Mendes Giannini M. 2013. *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. *Journal of Medical Microbiology.* **62**, 10-24
- Scott, L., and Simpson, D. 2007. Voriconazole: a review of its use in the management of invasive fungal infections. *Drugs.* **67**(2):269-98
- Seleem, D., Pardi, V., and Murata, R. 2016. Review of flavonoids: a diverse group of natural compounds with anti-*Candida albicans* activity *in vitro*. *Archives of Oral Biology.* **76**: 76-83
- Sell, C., 2010. Chemistry of Essential Oils in Cap 5 - Handbook of Essential Oils: science, technology, and applications, Baser, K., and Buchbauer, G. CRC Press - Taylor & Francis Group, New York
- Seow, YX., Yeo, CR., Chung, HL, and Yuk, H-G. 2014. Plant Essential Oils as Active Antimicrobial Agents. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **54**:625-644

- Shalini, K., Kumar, N., Drabu, S., and Sharma, P. K. 2011. Advances in synthetic approach to and antifungal activity of triazoles. *Beilstein Journal of Organic Chemistry*. **7**, 668–677. <http://doi.org/10.3762/bjoc.7.79>
- Shu, C., Sun, L., and Zhang, W. 2016. Thymol has antifungal activity against *Candida albicans* during infection and maintains the innate immune response required for function of the p38 MAPK signaling pathway in *Caenorhabditis elegans*. *Immunol Res*. **64**(4):1034-24. doi: 10.1007/s12026-016-8785-y.
- Shweta, S., Fatima, Z. and Hameed, S. 2016. Citronellal-induced disruption of membrane homeostasis in *Candida albicans* and attenuation of its virulence attributes. *Rev Soc Bras Med Trop*. **49**(4): 465-472
- Silva, A., Lopes, P., Azevedo, M., Costa, D., Alviano, C., and Alviano, D. 2012. Biological Activities of α -Pinene and β -Pinene Enantiomers. *Molecules*. **17**, 6305-6316
- Silva, S., Negri, M., Henriques, M., Oliveira, R., Williams, D., and Azeredo, J. 2012. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. *FEMS Microbiol Rev*. **36**, 288-305
- Silva, W, Seneviratne, J., Parahitiyawa, N., Rosa, E., Samaranayake, L., and Cury, A. 2008. Improvement of XTT assay performance for studies involving *Candida albicans* biofilms. *Braz. Dent. J.* **19**:364-369 <https://dx.doi.org/10.1590/S0103-64402008000400014>
- Soltani, R., Khalili, H, e Shafiee, F. 2012. Double-disk synergy test for detection of synergistic effect between antibiotics against nosocomial strains of *Staphylococcus aureus*. *J Res Pharm Pract*. **1**(1): 21-24. doi: 10.4103/2279.042X.99673)
- Suntres, ZE., Coccimiglio, J., and Alipour, M. 2015. The bioactivity and toxicological actions of carvacrol. *Crit Rev Sci Nutr*. **55**:304-18
- Taff, HT., Mitchell, KF., Edward, JA., and Andes DR. 2013. Mechanisms of *Candida* biofilm drug resistance. *Future Microbiol*. **8**(10): 10.2217/fmb.13.101
- Taff, HT., Nett, JE., and Andes, DR. 2012. Comparative analysis of *Candida* biofilm quantitation assays. *Med Mycol*. **50**(2): 214-8. doi: 10.3109/13693786.2011.580016

- Tampieri, MP., Galuppi, R., Macchiono, F., Carelle, MS., Falconi, L., Cioni, PL., and Morelli, I. 2005. The inhibition of *Candida albicans* by elected essential oils and major components. *Mycopathologia*. **159**(3):339-45
- Trindade, LA., Oliveira, J., de Castro, RD., Lima, E. 2015. Inhibition of adherence of *C. albicans* to dental implants and cover screws by *Cymbopogon nardus* essential oil and citronellal. *Clin Oral Investig*. **19**(9): 2223-31. doi: 10.1007/s00784-015-1050-
- Van Vuuren, SF., Suliman, S., and Viljoen, AM. 2009. The antimicrobial activity of four commercial essential oils in combination with conventional antimicrobials. *Let Appl Microbiol*. **48**(4): 440–446. doi: 10.1111/j.1472-765X.2008.02548.x
- Van Zyla, RL., Seatlholof, ST., Van Vuuren, SF., and Viljoen, A. 2010. Pharmacological interactions of essential oil constituents on the viability of micro-organisms. *Natur Prod Commun*. **5**(9): 1381–1386
- Verma, P. (2007) Methods for determining bactericidal activity and antimicrobial interactions: synergy testing, time-kill curves, and population analysis. in Schwalbe R, Steele-Moore L, Goodwin AC (eds) Antimicrobial susceptibility testing protocols. CRC Press, New York,
- Warrilow, A., Hull, C., Parker, J., Garvey, E., Hoekstar, W., Moore, W., Schotzinger, R., Kelly, D., and Kelly, S. 2014. The Clinical Candidate VT-1161 Is a Highly Potent Inhibitor of *Candida albicans* CYP51 but Fails To Bind the Human Enzyme. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **58**(12), 7121–7127. doi.org/10.1128/AAC.03707-14
- Wiederhold, NP., Patterson, TF. 2015. Emergence of azole resistance in *Aspergillus*. *Semin Respir Crit Care Med*. **36**:673-80
- Xu, Y., Sheng, F., Zhao, J., Chen, L., and Li, C. 2015. ERG11 mutations and expression of resistance genes in fluconazole resistente *Candida albicans* isolates. *Arch Microbiol*. **197**(9): 1087-93. doi 10.1007/s00203-015-1146-8
- You, J., Du, L., King, JB., Hall, B., Cichewicz, R., 2013. Small-molecule suppressors of *Candida albicans* biofilm formation synergistically enhance the antifungal activity of amphotericin B against clinical *Candida* isolates. *ACS Chem Biol*. **8**(4):840-848

- Zahran, KM., Agban, MN., Ahmed, SH., Hassan, EA., and Sabet, MA. 2015. Patterns of *Candida* biofilm on intrauterine devices. J Med Microbiol. **64**(Pt4): 375-81. doi: 10.1099/jmm.0.000042

6. ANEXOS

Anexo I

Tabela A1. Médias de absorvâncias para determinação das CMI₅₀ e CMI₈₀ de compostos naturais e agentes antifúngicos contra *Candida albicans* ATCC 90028

Composto	Gradiente de concentração (mg/L)										CP
	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	
Fluconazol	0,058	0,066	0,142	0,041	0,095	0,055	0,073	0,149	0,078	0,224	0,348
	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,062	0,031	0,016	0,008	
Voriconazol	0,049	0,046	0,054	0,058	0,064	0,071	0,073	0,117	0,087	0,207	0,309
	256	128	64	32	16	8	4	2	1	0,5	
Carvacrol	-0,008	0,069	0,230	0,658	0,333	0,326	0,388	0,310	0,296	0,676	0,264
α-Pino	0,397	0,256	0,304	0,287	0,283	0,285	0,271	0,260	0,262	0,252	0,238
Citronelal	0,429	0,428	0,530	0,422	0,394	0,266	0,463	0,268	0,428	0,376	0,279
Linalool	0,512	0,397	0,250	0,402	0,305	0,428	0,288	0,463	0,391	0,236	0,245
Eugenol	0,020	0,183	0,360	0,297	0,375	0,729	0,300	0,316	0,296	0,253	0,319
Nerolidol	1,049	0,352	0,311	0,330	0,307	0,282	0,286	0,283	0,276	0,280	0,269
Timol	0,012	0,100	1,345	1,623	1,669	1,563	1,493	1,499	1,403	1,406	1,376

Nota: a estes valores já foi descontado o valor do controlo negativo

Tabela A2. Médias de absorvâncias para determinação das CMI₅₀ e CMI₈₀ de compostos naturais e agentes antifúngicos contra *Candida albicans* SER7

Composto	Gradiente de concentração (mg/L)										CP
	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	
Fluconazol	0,112	0,132	0,213	0,566	0,436	0,657	0,727	0,786	0,723	0,749	0,762
	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,062	0,031	0,016	0,008	
Voriconazol	0,186	0,147	0,136	0,142	0,249	0,477	0,675	0,769	0,728	0,857	0,726
	256	128	64	32	16	8	4	2	1	0,5	
Carvacrol	-0,008	0,125	0,824	0,872	0,916	1,028	0,933	0,922	0,907	0,896	0,903
Eugenol	0,608	0,726	0,824	0,884	0,905	0,916	0,888	0,930	0,870	0,895	0,846
Timol	0,191	0,587	0,854	0,933	0,937	1,001	0,968	0,960	0,922	0,922	0,870

Nota: a estes valores já foi descontado o valor do controlo negativo

Tabela A3. Médias de absorvâncias para determinação das CMI₅₀ e CMI₈₀ de compostos naturais e agentes antifúngicos contra *Candida parapsilosis* CAN260

Composto	Gradiente de concentração (mg/L)										CP
	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	
Fluconazol	-0,011	-0,002	0,000	0,019	0,012	0,016	0,042	0,229	0,601	0,855	0,922
	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,062	0,031	0,016	0,008	
Voriconazol	0,001	0,029	0,041	0,044	0,046	0,050	0,070	0,087	0,121	0,698	0,962
	256	128	64	32	16	8	4	2	1	0,5	
Carvacrol	0,001	0,011	0,084	0,361	0,720	0,925	0,892	0,933	0,940	0,960	0,908
Eugenol	-0,035	0,073	0,119	0,381	0,696	0,835	0,826	0,892	0,849	0,907	0,880
Timol	-0,004	0,031	0,756	1,051	1,155	1,238	1,238	1,247	1,273	1,264	1,262

Nota: a estes valores já foi descontado o valor do controlo negativo

Tabela A4. Médias de absorvâncias para determinação das CMI₅₀ e CMI₈₀ de compostos naturais e agentes antifúngicos contra *Candida parapsilosis* 59/13

Composto	Gradiente de concentração (mg/L)										CP
	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	
Fluconazol	-0,008	-0,001	0,003	0,009	0,017	0,010	0,014	0,023	0,057	0,123	0,162
	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,062	0,031	0,016	0,008	
Voriconazol	0,021	0,032	0,047	0,056	0,051	0,060	0,068	0,051	0,071	0,104	0,167
	256	128	64	32	16	8	4	2	1	0,5	
Carvacrol	-0,012	0,022	0,060	0,096	0,135	0,155	0,168	0,181	0,159	0,155	0,155
Eugenol	0,001	0,055	0,097	0,137	0,149	0,164	0,156	0,165	0,181	0,159	0,166
Timol	0,001	0,024	0,153	0,241	0,299	0,299	0,346	0,338	0,344	0,363	0,341

Nota: a estes valores já foi descontado o valor do controlo negativo

Tabela A5. Médias de absorvâncias para determinação das CMI₅₀ e CMI₈₀ de compostos naturais e agentes antifúngicos contra *Candida parapsilosis* 246/11

Composto	Gradiente de concentração (mg/L)										CP
	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	
Fluconazol	0,014	0,029	0,033	0,024	0,016	0,018	0,026	0,107	0,127	0,116	0,155
	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,062	0,031	0,016	0,008	
Voriconazol	0,038	0,062	0,066	0,065	0,062	0,051	0,053	0,056	0,118	0,661	0,182
	256	128	64	32	16	8	4	2	1	0,5	
Carvacrol	-0,006	0,032	0,083	0,119	0,138	0,164	0,160	0,169	0,156	0,154	0,145
Eugenol	0,004	0,099	0,152	0,144	0,152	0,164	0,162	0,166	0,181	0,186	0,174
Timol	-0,001	0,027	0,108	0,841	1,050	1,114	1,124	1,171	1,243	1,231	1,195

Nota: a estes valores já foi descontado o valor do controlo negativo

Tabela A6. Médias de absorvâncias para determinação das CMI₅₀ e CMI₈₀ de compostos naturais e agentes antifúngicos contra *Candida krusei* 5/11

Composto	Gradiente de concentração (mg/L)										CP
	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	
Fluconazol	-0,035	0,126	0,483	0,487	0,560	0,580	0,679	0,379	0,254	0,588	0,177
	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,062	0,031	0,016	0,008	
Voriconazol	0,051	0,046	0,081	0,056	0,211	0,571	0,611	0,978	0,932	0,989	0,750
	256	128	64	32	16	8	4	2	1	0,5	
Carvacrol	-0,045	0,017	0,104	0,159	0,186	0,193	0,199	0,222	0,238	0,202	0,225
Eugenol	0,037	0,082	0,130	0,171	0,193	0,207	0,219	0,241	0,235	0,311	0,234
Timol	0,000	0,255	0,696	0,924	1,146	1,098	1,218	1,132	1,168	1,125	0,956

Nota: a estes valores já foi descontado o valor do controlo negativo

Tabela A7. Médias de absorvâncias para determinação das CMI₅₀ e CMI₈₀ de compostos naturais e agentes antifúngicos contra *Candida krusei* 282/09

Composto	Gradiente de concentração (mg/L)										CP
	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	
Fluconazol	0,006	0,034	0,080	0,292	0,263	0,215	0,249	0,251	0,264	0,252	0,233
	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,062	0,031	0,016	0,008	
Voriconazol	0,019	0,028	0,028	0,038	0,033	0,367	0,923	0,967	0,229	0,224	0,248
	256	128	64	32	16	8	4	2	1	0,5	
Carvacrol	-0,028	0,028	0,117	0,188	0,241	0,268	0,265	0,273	0,250	0,254	0,241
Eugenol	0,051	0,116	0,181	0,255	0,243	0,254	0,290	0,295	0,255	0,240	0,208
Timol	0,004	0,055	0,865	0,709	0,729	0,729	0,730	0,743	0,831	0,766	0,707

Nota: a estes valores já foi descontado o valor do controlo negativo

Tabela A8. Médias de absorvâncias para determinação das CMI₅₀ e CMI₈₀ de compostos naturais e agentes antifúngicos contra *Candida glabrata* 50/14

Composto	Gradiente de concentração (mg/L)										CP
	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	
Fluconazol	0,030	0,025	0,032	0,043	0,092	0,215	0,216	0,214	0,216	0,219	0,223
	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,062	0,031	0,016	0,008	
Voriconazol	0,027	0,024	0,026	0,028	0,041	0,068	0,134	0,197	0,208	0,218	0,212
	256	128	64	32	16	8	4	2	1	0,5	
Carvacrol	-0,002	0,019	0,128	0,180	0,180	0,196	0,230	0,260	0,193	0,196	0,190
Eugenol	0,087	0,153	0,182	0,186	0,170	0,180	0,172	0,179	0,189	0,185	0,176
Timol	-0,003	0,544	0,736	0,793	0,816	0,799	0,787	0,799	0,870	0,875	0,799

Nota: a estes valores já foi descontado o valor do controlo negativo

Tabela A9. Médias de absorvâncias para determinação das CMI₅₀ e CMI₈₀ de compostos naturais e agentes antifúngicos contra *Candida glabrata* 531/14

Composto	Gradiente de concentração (mg/L)										CP
	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	
Fluconazol	-0,048	0,023	0,108	0,136	0,125	0,156	0,170	0,177	0,196	0,200	0,179
	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,062	0,031	0,016	0,008	
Voriconazol	0,000	0,026	0,044	0,045	0,098	0,202	0,236	0,222	0,201	0,191	0,168
	256	128	64	32	16	8	4	2	1	0,5	
Carvacrol	-0,052	-0,017	0,074	0,117	0,162	0,158	0,186	0,169	0,168	0,179	0,162
Eugenol	0,061	0,121	0,151	0,174	0,192	0,186	0,198	0,177	0,171	0,168	0,143
Timol	0,017	0,042	0,550	0,559	0,580	0,561	0,592	0,612	0,608	0,491	0,563

Nota: a estes valores já foi descontado o valor do controlo negativo

Tabela A10. Médias de absorvâncias para determinação das CMI₅₀ e CMI₈₀ de compostos naturais e agentes antifúngicos contra *Candida guilliermondii* 112/13

Composto	Gradiente de concentração (mg/L)										CP
	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	
Fluconazol	-0,013	0,004	0,008	0,018	0,016	0,020	0,074	0,086	0,103	0,090	0,109
	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,062	0,031	0,016	0,008	
Voriconazol	-0,012	0,014	0,033	0,041	0,037	0,038	0,071	0,117	0,110	0,066	0,081
	256	128	64	32	16	8	4	2	1	0,5	
Carvacrol	-0,007	0,009	0,084	0,075	0,075	0,096	0,097	0,092	0,091	0,073	0,095
Eugenol	0,012	0,070	0,098	0,098	0,107	0,115	0,113	0,112	0,112	0,088	0,085
Timol	-0,006	0,014	0,074	0,128	0,181	0,463	0,354	0,333	0,266	0,282	0,299

Nota: a estes valores já foi descontado o valor do controlo negativo

Tabela A11. Médias de absorvâncias obtidas nos testes para determinar a existência de sinergia na actividade antifúngica de misturas entre fluconazol e carvacrol a diferentes concentrações contra *Candida parapsilosis* 246/11

		[Fluconazol] mg/L										CP
		64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,325
[Carvacrol] mg/L	256	-0,005	-0,005	-0,005	-0,004	-0,005	-0,003	-0,004	-0,005	-0,004	-0,004	
	128	-0,003	-0,003	-0,001	-0,002	0,007	0,010	0,014	0,011	0,011	0,026	
	64	-0,001	-0,002	0,0011	0,005	0,030	0,035	0,054	0,047	0,055	0,072	
	32	-0,001	-0,002	-0,000	0,004	0,055	0,054	0,098	0,102	0,111	0,118	
	16	0,001	-0,002	-0,001	0,008	0,141	0,264	0,486	0,352	0,322	0,278	
	8	-0,000	-0,001	-0,001	0,247	0,311	0,543	0,523	0,392	0,190	0,417	
	4	0,000	-0,003	0,003	0,0006	0,1466	0,3016	0,463	0,399	0,148	0,233	
	2	0,004	0,002	0,004	0,004	0,024	0,081	0,541	0,203	0,197	0,222	

Nota: a estes valores já foi descontado o valor do controlo negativo

Tabela A12. Médias de absorvâncias obtidas nos testes para determinar a existência de sinergia na actividade antifúngica de misturas entre fluconazol e eugenol a diferentes concentrações contra *Candida parapsilosis* 246/11

		[Fluconazol] mg/L										CP
		64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,927
[Eugenol] mg/L	256	-0,007	-0,007	-0,007	-0,006	0,013	-0,002	-0,005	-0,004	0,006	0,008	
	128	-0,006	-0,008	-0,001	-0,006	0,028	0,050	0,054	0,064	0,061	0,070	
	64	-0,002	-0,007	-0,006	-0,005	0,024	0,044	0,094	0,114	0,111	0,128	
	32	-0,007	-0,006	-0,008	-0,006	0,030	0,202	0,295	0,205	0,200	0,258	
	16	-0,004	-0,006	-0,006	0,027	0,020	0,195	0,606	0,346	0,178	0,165	
	8	-0,003	-0,007	-0,007	-0,007	-0,004	0,030	0,460	0,731	0,303	0,214	
	4	-0,002	-0,004	-0,006	-0,004	-0,006	0,001	0,328	0,766	0,341	0,201	
	2	-0,001	-0,004	-0,004	-0,006	-0,001	-0,001	0,093	0,598	0,398	0,249	

Nota: a estes valores já foi descontado o valor do controlo negativo

Tabela A13. Médias de absorvâncias obtidas nos testes para determinar a existência de sinergia na actividade antifúngica de misturas entre fluconazol e timol a diferentes concentrações contra *Candida parapsilosis* 246/11

		[Fluconazol] mg/L										CP
		64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	1,317
[Timol] mg/L	256	-0,008	-0,005	0,154	-0,005	-0,007	-0,005	-0,008	-0,010	-0,008	-0,009	
	128	-0,009	-0,008	0,180	0,003	0,000	0,003	0,004	0,007	0,004	0,013	
	64	-0,008	-0,008	0,571	0,052	0,036	0,037	0,041	0,081	0,331	0,924	
	32	-0,007	-0,008	1,056	1,092	1,081	1,153	0,647	1,122	1,178	1,251	
	16	-0,006	-0,008	1,007	1,338	1,286	1,315	0,954	1,221	1,334	0,955	
	8	-0,006	-0,007	1,057	1,399	1,372	1,384	1,116	0,768	1,357	1,388	
	4	-0,006	-0,007	1,020	1,393	1,406	1,381	1,172	1,038	1,383	1,110	
	2	-0,004	-0,003	1,149	1,473	1,474	1,457	0,810	0,791	1,467	1,493	

Nota: a estes valores já foi descontado o valor do controlo negativo

Tabela A14. Médias de absorvâncias obtidas nos testes para determinar a existência de sinergia na actividade antifúngica de misturas entre voriconazol e carvacrol a diferentes concentrações contra *Candida parapsilosis* 246/11

		[Voriconazol] mg/L										CP
		4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,062	0,031	0,016	0,008	0,571
[Carvacrol] mg/L	256	-0,007	-0,007	-0,008	-0,008	-0,008	0,042	-0,003	-0,007	-0,010	-0,012	
	128	-0,009	-0,008	-0,007	-0,004	-0,007	-0,007	0,004	0,008	0,012	0,022	
	64	-0,007	-0,006	-0,007	-0,007	-0,005	-0,002	0,015	0,029	0,045	0,071	
	32	-0,007	-0,008	-0,007	-0,005	0,171	0,012	0,028	0,068	0,157	0,442	
	16	-0,005	-0,006	-0,006	-0,006	-0,003	0,002	0,060	0,130	0,144	0,518	
	8	-0,004	-0,006	0,002	-0,003	0,001	0,008	0,056	0,093	0,206	0,548	
	4	-0,004	-0,006	-0,007	-0,003	-0,004	0,003	0,041	0,093	0,176	0,465	
	2	0,006	-0,004	-0,003	-0,003	-0,003	-0,003	0,018	0,075	0,186	0,513	

Nota: a estes valores já foi descontado o valor do controlo negativo

Tabela A15. Médias de absorvâncias obtidas nos testes para determinar a existência de sinergia na actividade antifúngica de misturas entre voriconazol e eugenol a diferentes concentrações contra *Candida parapsilosis* 246/11

		[Voriconazol] mg/L										CP
		4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,062	0,031	0,016	0,008	0,409
[Eugenol] mg/L	256	-0,003	-0,015	-0,015	-0,010	0,000	-0,010	-0,004	-0,004	0,004	0,022	
	128	-0,015	-0,014	-0,014	-0,014	-0,008	0,00	0,021	0,026	0,039	0,064	
	64	-0,013	-0,014	-0,012	-0,017	-0,008	0,044	0,027	0,083	0,263	0,358	
	32	-0,013	-0,013	-0,016	0,138	-0,009	0,005	0,030	0,273	0,095	0,484	
	16	-0,012	-0,018	-0,014	-0,012	0,198	-0,003	0,026	0,088	0,104	0,138	
	8	-0,011	-0,016	-0,013	-0,011	-0,010	0,029	0,219	0,275	0,092	0,125	
	4	0,084	-0,015	-0,017	-0,012	-0,011	-0,011	0,061	0,254	0,073	0,132	
	2	-0,008	-0,008	-0,010	-0,007	-0,008	-0,008	-0,007	0,002	0,082	0,172	

Nota: a estes valores já foi descontado o valor do controlo negativo

Tabela A16. Médias de absorvâncias obtidas nos testes para determinar a existência de sinergia na actividade antifúngica de misturas entre voriconazol e timol a diferentes concentrações contra *Candida parapsilosis* 246/11

		[Voriconazol] mg/L										CP
		4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,062	0,031	0,016	0,008	1,339
[Timol] mg/L	256	-0,007	-0,011	-0,011	-0,008	-0,006	-0,006	-0,006	-0,009	-0,007	-0,007	
	128	-0,009	-0,007	-0,006	-0,007	0,011	0,003	0,007	0,011	0,013	0,023	
	64	-0,003	-0,003	-0,003	-0,007	0,034	0,034	0,074	0,046	0,382	0,838	
	32	-0,006	-0,006	-0,005	-0,003	0,679	1,088	1,159	0,441	1,117	1,281	
	16	-0,005	-0,005	-0,005	-0,003	0,650	1,204	1,327	0,376	1,168	1,343	
	8	-0,003	-0,005	-0,005	-0,002	0,861	1,390	1,368	0,577	1,354	1,398	
	4	-0,006	-0,004	-0,003	-0,002	0,826	1,330	1,380	0,605	1,299	1,412	
	2	-0,002	-0,002	-0,003	-0,002	1,209	1,500	1,490	0,689	1,473	1,493	

Nota: a estes valores já foi descontado o valor do controlo negativo

Tabela A17. Médias de absorvâncias obtidas nos testes para determinar a existência de sinergia na actividade antifúngica de misturas entre fluconazol e carvacrol a diferentes concentrações contra *Candida krusei* 5/11

		[Fluconazol] mg/L										CP
		64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,668
[Carvacrol] mg/L	256	-0,006	-0,007	-0,005	-0,005	-0,006	-0,002	-0,004	-0,003	0,001	-0,005	
	128	-0,003	0,027	0,040	0,045	0,048	0,061	0,070	0,071	0,074	0,137	
	64	0,031	0,236	0,184	0,181	0,193	0,217	0,197	0,203	0,224	0,259	
	32	0,057	0,225	0,231	0,225	0,246	0,270	0,275	0,264	0,272	0,318	
	16	0,016	0,222	0,257	0,269	0,278	0,305	0,314	0,299	0,308	0,338	
	8	0,005	0,199	0,256	0,272	0,278	0,331	0,329	0,328	0,340	0,372	
	4	0,007	0,206	0,258	0,279	0,299	0,318	0,319	0,341	0,446	0,383	
	2	0,003	0,203	0,268	0,304	0,300	0,348	0,331	0,331	0,640	0,377	

Nota: a estes valores já foi descontado o valor do controlo negativo

Tabela A18. Médias de absorvâncias obtidas nos testes para determinar a existência de sinergia na actividade antifúngica de misturas entre fluconazol e eugenol a diferentes concentrações contra *Candida krusei* 5/11

		[Fluconazol] mg/L										CP
		64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,708
[Eugenol] mg/L	256	0,011	0,299	0,171	0,156	0,178	0,154	0,117	0,151	0,190	0,181	
	128	0,105	0,183	0,271	0,230	0,270	0,242	0,240	0,308	0,249	0,279	
	64	0,152	0,204	0,240	0,252	0,273	0,299	0,270	0,260	0,268	0,333	
	32	0,103	0,228	0,241	0,279	0,302	0,315	0,299	0,363	0,292	0,343	
	16	0,044	0,264	0,299	0,345	0,307	0,322	0,301	0,328	0,339	0,536	
	8	0,214	0,203	0,279	0,427	0,440	0,324	0,369	0,314	0,332	0,423	
	4	0,021	0,196	0,304	0,325	0,330	0,409	0,376	0,324	0,377	0,378	
	2	-0,007	0,190	0,324	0,332	0,338	0,372	0,365	0,354	0,376	0,432	

Nota: a estes valores já foi descontado o valor do controlo negativo

Tabela A19. Médias de absorvâncias obtidas nos testes para determinar a existência de sinergia na actividade antifúngica de misturas entre fluconazol e timol a diferentes concentrações contra *Candida krusei* 5/11

		[Fluconazol] mg/L										CP
		64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	1,217
[Timol] mg/L	256	-0,003	0,002	0,003	-0,001	-0,002	-0,001	-0,001	-0,003	-0,002	0,018	
	128	0,001	0,010	0,032	0,034	0,040	0,041	0,032	0,093	0,202	0,844	
	64	0,072	0,594	0,929	1,152	1,183	1,141	1,115	1,176	1,056	1,328	
	32	0,166	0,617	0,736	1,251	1,050	1,348	1,322	1,349	1,375	1,343	
	16	0,187	0,565	0,647	1,220	1,231	1,266	1,307	1,217	1,269	1,246	
	8	0,106	0,531	0,581	1,124	0,947	1,165	0,980	1,157	0,941	1,149	
	4	0,030	0,384	0,596	0,966	0,980	1,001	1,019	0,943	0,820	0,945	
	2	0,005	0,416	0,615	1,230	1,245	1,142	0,991	1,174	1,222	1,212	

Nota: a estes valores já foi descontado o valor do controlo negativo

Tabela A20. Médias de absorvâncias obtidas nos testes para determinar a existência de sinergia na actividade antifúngica de misturas entre voriconazol e carvacrol a diferentes concentrações contra *Candida krusei* 5/11

		[Voriconazol] mg/L										CP
		4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,062	0,031	0,016	0,008	0,697
[Carvacrol] mg/L	256	-0,005	-0,005	-0,004	-0,004	-0,002	-0,003	-0,004	-0,006	-0,006	-0,007	
	128	-0,003	-0,002	-0,001	0,001	0,034	0,044	0,066	0,076	0,061	0,129	
	64	-0,003	-0,002	0,007	0,093	0,274	0,157	0,148	0,171	0,187	0,216	
	32	-0,003	-0,001	0,005	0,140	0,236	0,221	0,195	0,213	0,229	0,261	
	16	-0,005	-0,004	0,005	0,073	0,275	0,275	0,268	0,260	0,277	0,301	
	8	-0,005	-0,003	-0,002	0,049	0,279	0,311	0,283	0,257	0,310	0,316	
	4	-0,002	0,001	0,000	0,043	0,308	0,325	0,292	0,288	0,310	0,317	
	2	0,001	0,000	0,001	0,028	0,301	0,284	0,342	0,301	0,386	0,330	

Nota: a estes valores já foi descontado o valor do controlo negativo

Tabela A21. Médias de absorvâncias obtidas nos testes para determinar a existência de sinergia na actividade antifúngica de misturas entre voriconazol e eugenol a diferentes concentrações contra *Candida krusei* 5/11

		[Voriconazol] mg/L										CP
		4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,062	0,031	0,016	0,008	0,706
[Eugenol] mg/L	256	-0,006	-0,005	0,004	0,064	0,105	0,101	0,127	0,130	0,137	0,183	
	128	-0,005	-0,001	0,028	0,151	0,165	0,170	0,196	0,218	0,229	0,256	
	64	-0,007	-0,004	0,055	0,245	0,265	0,248	0,255	0,265	0,296	0,314	
	32	-0,007	-0,006	0,032	0,326	0,333	0,287	0,278	0,293	0,368	0,383	
	16	-0,006	-0,008	0,003	0,242	0,324	0,353	0,292	0,290	0,304	0,370	
	8	-0,007	-0,008	-0,003	0,157	0,292	0,356	0,318	0,300	0,374	0,341	
	4	-0,007	-0,006	-0,003	0,080	0,308	0,320	0,308	0,362	0,329	0,324	
	2	-0,006	-0,005	-0,005	0,055	0,327	0,330	0,339	0,406	0,313	0,345	

Nota: a estes valores já foi descontado o valor do controlo negativo

Tabela A22. Médias de absorvâncias obtidas nos testes para determinar a existência de sinergia na actividade antifúngica de misturas entre voriconazol e timol a diferentes concentrações contra *Candida krusei* 5/11

		[Voriconazol] mg/L										CP
		4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,062	0,031	0,016	0,008	1,122
[Timol] mg/L	256	-0,015	-0,013	-0,012	-0,011	-0,015	-0,014	-0,015	-0,016	-0,018	-0,016	
	128	-0,013	-0,011	-0,008	-0,008	0,168	0,221	0,138	0,192	0,486	0,751	
	64	-0,011	-0,007	0,006	0,114	1,172	1,144	1,090	1,197	1,229	1,027	
	32	-0,012	-0,006	0,026	0,344	1,369	1,362	1,349	1,375	1,292	1,153	
	16	-0,009	-0,005	0,038	0,385	1,369	1,350	1,389	1,307	1,352	1,002	
	8	-0,012	-0,011	-0,003	0,348	1,305	1,346	1,302	1,316	1,245	0,954	
	4	0,027	-0,010	-0,009	0,258	1,315	1,269	1,346	1,302	1,234	0,885	
	2	-0,008	0,134	-0,005	0,251	1,392	1,331	1,419	1,385	1,353	1,085	

Nota: a estes valores já foi descontado o valor do controlo negativo

Tabela A23. Médias de absorvâncias obtidas nos testes para determinar a existência de sinergia na actividade antifúngica de misturas entre fluconazol e carvacrol a diferentes concentrações contra *Candida glabrata* 531/14

		[Fluconazol] mg/L										CP
		64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,488
[Carvacrol] mg/L	256	-0,004	-0,007	-0,009	0,016	0,004	0,007	0,019	0,023	0,023	0,030	
	128	-0,006	-0,006	0,005	0,024	0,030	0,037	0,046	0,054	0,054	0,097	
	64	0,000	0,009	0,025	0,054	0,073	0,090	0,109	0,116	0,155	0,168	
	32	0,013	0,029	0,063	0,107	0,121	0,198	0,141	0,149	0,170	0,296	
	16	0,013	0,038	0,054	0,087	0,125	0,143	0,235	0,166	0,184	0,247	
	8	0,010	0,040	0,067	0,087	0,145	0,169	0,162	0,173	0,181	0,260	
	4	0,007	0,145	0,071	0,092	0,155	0,152	0,177	0,202	0,198	0,220	
	2	0,002	0,055	0,085	0,096	0,156	0,177	0,193	0,206	0,218	0,242	

Nota: a estes valores já foi descontado o valor do controlo negativo

Tabela A24. Médias de absorvâncias obtidas nos testes para determinar a existência de sinergia na actividade antifúngica de misturas entre fluconazol e eugenol a diferentes concentrações contra *Candida glabrata* 531/14

		[Fluconazol] mg/L										CP
		64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,499
[Eugenol] mg/L	256	0,006	0,033	0,052	0,050	0,073	0,081	0,093	0,098	0,093	0,108	
	128	0,018	0,054	0,077	0,086	0,116	0,138	0,136	0,146	0,157	0,188	
	64	0,027	0,083	0,113	0,114	0,153	0,174	0,197	0,180	0,186	0,230	
	32	0,036	0,101	0,128	0,137	0,170	0,186	0,192	0,200	0,204	0,236	
	16	0,031	0,108	0,143	0,149	0,186	0,209	0,256	0,224	0,295	0,244	
	8	0,021	0,101	0,141	0,158	0,224	0,207	0,253	0,210	0,388	0,259	
	4	0,017	0,092	0,140	0,165	0,211	0,212	0,229	0,234	0,241	0,265	
	2	0,011	0,085	0,156	0,159	0,213	0,231	0,253	0,242	0,225	0,295	

Nota: a estes valores já foi descontado o valor do controlo negativo

Tabela A25. Médias de absorvâncias obtidas nos testes para determinar a existência de sinergia na actividade antifúngica de misturas entre fluconazol e timol a diferentes concentrações contra *Candida glabrata* 531/14

		[Fluconazol] mg/L										CP
		64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,704
[Timol] mg/L	256	-0,005	-0,003	-0,001	-0,004	-0,003	-0,002	-0,002	-0,002	-0,004	-0,005	
	128	-0,002	-0,002	0,000	0,000	-0,005	-0,001	-0,003	-0,005	-0,005	0,004	
	64	0,064	0,120	0,221	0,349	0,398	0,264	0,338	0,455	0,489	0,534	
	32	0,161	0,269	0,443	0,574	0,530	0,539	0,491	0,544	0,578	0,600	
	16	0,233	0,386	0,497	0,629	0,632	0,597	0,624	0,576	0,691	0,639	
	8	0,217	0,385	0,539	0,687	0,663	0,652	0,648	0,685	0,651	0,657	
	4	0,226	0,375	0,577	0,659	0,486	0,669	0,467	0,720	0,669	0,735	
	2	0,177	0,438	0,566	0,711	0,784	0,663	0,768	0,741	0,729	0,750	

Nota: a estes valores já foi descontado o valor do controlo negativo

Tabela A26. Médias de absorvâncias obtidas nos testes para determinar a existência de sinergia na actividade antifúngica de misturas entre voriconazol e carvacrol a diferentes concentrações contra *Candida glabrata* 531/14

		[Voriconazol] mg/L										CP
		4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,062	0,031	0,016	0,008	0,452
[Carvacrol] mg/L	256	-0,011	-0,008	-0,006	-0,005	-0,006	-0,004	-0,005	-0,004	-0,005	-0,004	
	128	-0,004	-0,005	-0,004	-0,004	0,005	0,092	0,000	0,001	0,007	0,028	
	64	-0,004	0,001	0,005	0,025	0,043	0,055	0,069	0,072	0,082	0,114	
	32	-0,003	-0,004	0,004	0,046	0,081	0,094	0,106	0,115	0,131	0,154	
	16	0,001	-0,001	0,055	0,034	0,078	0,106	0,210	0,158	0,160	0,275	
	8	0,001	0,153	0,004	0,039	0,104	0,128	0,162	0,157	0,178	0,191	
	4	0,001	0,001	0,005	0,030	0,122	0,129	0,160	0,157	0,195	0,187	
	2	-0,001	0,002	0,002	0,019	0,144	0,140	0,162	0,206	0,191	0,211	

Nota: a estes valores já foi descontado o valor do controlo negativo

Tabela A27. Médias de absorvâncias obtidas nos testes para determinar a existência de sinergia na actividade antifúngica de misturas entre voriconazol e eugenol a diferentes concentrações contra *Candida glabrata* 531/14

		[Voriconazol] mg/L										CP
		4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,062	0,031	0,016	0,008	0,482
[Eugenol] mg/L	256	-0,003	-0,005	-0,007	0,021	0,017	0,027	0,045	0,054	0,092	0,095	
	128	-0,006	-0,005	0,009	0,036	0,060	0,062	0,108	0,095	0,100	0,126	
	64	0,110	-0,003	0,009	0,039	0,066	0,089	0,142	0,129	0,166	0,195	
	32	-0,003	0,150	0,013	0,070	0,170	0,175	0,122	0,127	0,160	0,293	
	16	0,158	-0,005	0,000	0,168	0,083	0,105	0,210	0,148	0,158	0,220	
	8	-0,004	0,159	-0,002	0,250	0,106	0,120	0,145	0,131	0,177	0,232	
	4	-0,003	0,194	0,001	0,208	0,114	0,109	0,142	0,169	0,206	0,205	
	2	-0,003	-0,002	0,000	0,013	0,128	0,126	0,156	0,176	0,167	0,251	

Nota: a estes valores já foi descontado o valor do controlo negativo

Tabela A28. Médias de absorvâncias obtidas nos testes para determinar a existência de sinergia na actividade antifúngica de misturas entre voriconazol e timol a diferentes concentrações contra *Candida glabrata* 531/14

		[Voriconazol] mg/L										CP
		4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,062	0,031	0,016	0,008	0,692
[Timol] mg/L	256	0,003	-0,001	-0,002	0,000	-0,004	-0,004	-0,005	-0,006	-0,004	-0,005	
	128	-0,001	0,000	0,002	0,001	-0,001	0,003	0,001	0,003	0,000	0,085	
	64	0,040	0,061	0,146	0,304	0,463	0,472	0,462	0,537	0,518	0,728	
	32	0,064	0,161	0,279	0,413	0,575	0,607	0,571	0,604	0,594	0,643	
	16	0,057	0,151	0,304	0,426	0,623	0,631	0,626	0,639	0,657	0,686	
	8	0,051	0,135	0,312	0,466	0,692	0,658	0,661	0,657	0,669	0,713	
	4	0,034	0,137	0,308	0,504	0,683	0,699	0,687	0,686	0,678	0,694	
	2	0,025	0,131	0,307	0,524	0,729	0,704	0,750	0,707	0,736	0,737	

Nota: a estes valores já foi descontado o valor do controlo negativo

Tabela A29. Médias de absorvâncias obtidas nos testes para determinar a existência de sinergia na actividade antifúngica de misturas entre fluconazol e carvacrol a diferentes concentrações contra *Candida albicans* SER7

		[Fluconazol] mg/L										CP
		64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	1,123
[Carvacrol] mg/L	256	-0,003	-0,002	0,135	-0,001	-0,003	0,005	0,003	0,003	0,004	0,044	
	128	0,009	0,028	0,057	0,222	0,429	0,338	0,244	0,295	0,316	0,607	
	64	0,012	0,114	0,371	1,002	1,007	1,048	1,008	1,081	1,027	1,189	
	32	0,025	0,113	0,640	1,088	1,097	1,130	1,116	1,129	1,099	1,134	
	16	0,065	0,156	0,684	1,149	1,094	1,156	1,101	1,100	1,123	1,128	
	8	0,082	0,108	0,578	0,568	1,146	1,100	1,172	1,146	1,172	1,112	
	4	0,098	0,149	0,400	1,098	1,192	0,872	1,178	1,121	1,091	0,754	
	2	0,094	0,124	0,185	1,154	1,115	1,128	1,153	1,151	1,135	1,107	

Nota: a estes valores já foi descontado o valor do controlo negativo

Tabela A30. Médias de absorvâncias obtidas nos testes para determinar a existência de sinergia na actividade antifúngica de misturas entre fluconazol e eugenol a diferentes concentrações contra *Candida albicans* SER7

		[Fluconazol] mg/L										CP
		64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,748
[Eugenol] mg/L	256	0,003	0,006	0,020	0,521	0,488	0,546	0,498	0,497	0,591	0,569	
	128	0,002	0,007	0,045	0,701	0,670	0,670	0,654	0,680	0,688	0,679	
	64	0,013	0,017	0,066	0,708	0,702	0,684	0,702	0,698	0,710	0,784	
	32	0,198	0,034	0,057	0,714	0,689	0,737	0,652	0,732	0,694	0,717	
	16	0,051	0,054	0,073	0,722	0,682	0,710	0,706	0,666	0,714	0,694	
	8	0,078	0,064	0,087	0,713	0,722	0,689	0,691	0,726	0,782	0,723	
	4	0,069	0,078	0,117	0,678	0,707	0,681	0,706	0,674	0,609	0,754	
	2	0,075	0,085	0,122	0,731	0,723	0,742	0,702	0,700	0,710	0,708	

Nota: a estes valores já foi descontado o valor do controlo negativo

Tabela A31. Médias de absorvâncias obtidas nos testes para determinar a existência de sinergia na actividade antifúngica de misturas entre fluconazol e timol a diferentes concentrações contra *Candida albicans* SER7

		[Fluconazol] mg/L										CP
		64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,763
[Timol] mg/L	256	-0,003	-0,001	-0,004	-0,005	-0,003	-0,004	-0,003	-0,003	-0,003	-0,005	
	128	0,001	0,004	0,005	0,013	0,017	0,030	0,018	0,042	0,065	0,102	
	64	0,015	0,162	0,249	0,537	0,505	0,345	0,493	0,543	0,560	0,682	
	32	0,015	0,278	0,464	0,696	0,538	0,619	0,721	0,698	0,742	0,739	
	16	0,040	0,185	0,462	0,738	0,712	0,738	0,741	0,718	0,655	0,771	
	8	0,064	0,105	0,443	0,725	0,700	0,746	0,725	0,733	0,675	0,744	
	4	0,060	0,086	0,205	0,777	0,768	0,751	0,780	0,723	0,782	0,744	
	2	0,065	0,265	0,098	0,733	0,800	0,797	0,739	0,774	0,750	0,743	

Nota: a estes valores já foi descontado o valor do controlo negativo

Tabela A32. Médias de absorvâncias obtidas nos testes para determinar a existência de sinergia na actividade antifúngica de misturas entre voriconazol e carvacrol a diferentes concentrações contra *Candida albicans* SER7

		[Voriconazol] mg/L										CP
		4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,062	0,031	0,016	0,008	1,115
[Carvacrol] mg/L	256	0,000	0,024	0,000	0,001	0,000	0,001	0,001	0,000	0,001	0,024	
	128	0,026	0,032	0,047	0,170	0,192	0,212	0,195	0,205	0,263	0,731	
	64	0,064	0,211	0,396	1,001	0,961	1,027	0,969	1,017	1,032	1,131	
	32	0,078	0,313	0,694	1,100	1,109	1,082	1,092	1,085	1,070	1,123	
	16	0,098	0,273	0,725	1,106	1,114	1,117	1,111	1,109	1,135	1,156	
	8	0,116	0,218	0,629	1,141	1,093	1,131	1,117	1,097	1,120	1,126	
	4	0,122	0,161	0,398	0,935	0,943	0,927	0,972	0,919	0,935	0,944	
	2	0,108	0,154	0,304	0,947	0,964	0,942	0,936	0,956	0,952	1,002	

Nota: a estes valores já foi descontado o valor do controlo negativo

Tabela A33. Médias de absorvâncias obtidas nos testes para determinar a existência de sinergia na actividade antifúngica de misturas entre voriconazol e eugenol a diferentes concentrações contra *Candida albicans* SER7

		[Voriconazol] mg/L										CP
		4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,062	0,031	0,016	0,008	0,679
[Eugenol] mg/L	256	0,009	0,010	0,046	0,491	0,569	0,491	0,547	0,555	0,538	0,591	
	128	0,011	0,029	0,101	0,662	0,663	0,641	0,709	0,694	0,699	0,715	
	64	0,019	0,046	0,135	0,715	0,677	0,878	0,694	0,710	0,699	0,745	
	32	0,043	0,058	0,123	0,612	0,708	0,885	0,746	0,710	0,701	0,737	
	16	0,060	0,076	0,155	0,750	0,684	0,708	0,723	0,688	0,719	0,753	
	8	0,064	0,100	0,156	0,744	0,691	0,749	0,725	0,716	0,639	0,706	
	4	0,081	0,114	0,180	0,795	0,663	0,703	0,694	0,663	0,747	0,729	
	2	0,084	0,106	0,180	0,724	0,718	0,727	1,015	0,731	0,747	0,731	

Nota: a estes valores já foi descontado o valor do controlo negativo

TabelaA34. Médias de absorvâncias obtidas nos testes para determinar a existência de sinergia na actividade antifúngica de misturas entre voriconazol e timol a diferentes concentrações contra *Candida albicans* SER7

		[Voriconazol] mg/L										CP
		4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,062	0,031	0,016	0,008	0,717
[Timol] mg/L	256	-0,008	-0,004	-0,007	-0,006	-0,008	-0,006	-0,006	-0,007	-0,007	-0,006	
	128	0,005	0,001	0,007	0,016	0,036	0,045	0,051	0,080	0,020	0,148	
	64	0,059	0,132	0,233	0,515	0,490	0,420	0,404	0,460	0,514	0,670	
	32	0,065	0,240	0,451	0,739	0,662	0,710	0,707	0,864	0,760	0,777	
	16	0,079	0,239	0,474	0,732	0,697	0,662	0,734	0,910	0,745	0,772	
	8	0,086	0,151	0,352	0,719	0,671	0,719	0,701	0,694	0,723	0,716	
	4	0,082	0,122	0,318	0,721	0,698	0,721	0,721	0,721	0,750	0,807	
	2	0,085	0,122	0,216	0,777	0,755	0,740	0,738	0,776	0,792	0,823	

Nota: a estes valores já foi descontado o valor do controlo negativo

Tabela A35. Médias de absorvâncias para determinação da CMIS₅₀ e CMIS₈₀ de fluconazol e carvacrol individualmente e em combinações de diferentes proporções contra *Candida albicans* SER7

Composto	Gradiente de concentração (mg/L)										CP
	1024	512	256	128	64	32	16	8	4	2	
Fluconazol	0,090	0,527	0,365	0,385	0,415	0,380	0,421	0,414	0,381	0,615	0,608
	4096	2048	1024	512	256	128	64	32	16	8	
Carvacrol	0,045	0,106	0,123	0,187	0,282	0,375	0,433	0,336	0,422	0,591	0,493
Combinações¹											
M1	0,176	0,155	0,244	0,221	0,378	0,363	0,359	0,480	0,533	0,685	0,652
M2	0,035	0,060	0,116	0,212	0,316	0,391	0,531	0,578	0,867	0,632	0,650
M3	0,032	0,031	0,118	0,228	0,219	0,350	0,341	0,337	0,374	0,557	0,642
M4	0,028	0,030	0,041	0,114	0,168	0,246	0,346	0,393	0,414	0,451	0,445
M5	0,020	0,032	0,041	0,127	0,274	0,318	0,366	0,539	0,515	0,599	0,693

¹M1 - mistura 1; M2 - mistura 2; M3 - mistura 3; M4 - mistura 4; M5 - mistura 5

Nota: a estes valores já foi descontado o valor do controlo negativo